

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

*Acciones de la hormona adrenocorticotropa sobre  
la agregación plaquetaria y formación de trombo en  
la zona de lesión vascular*

ARANTXA ORTEGA POZZI

Madrid, 2008

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

*Acciones de la hormona adrenocorticotropa sobre la  
agregación plaquetaria y formación de trombo en la zona  
de lesión vascular*

Arantxa Ortega Pozzi, licenciada en Ciencias Biológicas

Directores: Panayotis Fantidis Sabbidu  
Alberto Muñoz Terol

Unidad de Medicina y Cirugía Experimentales  
Hospital Clínico San Carlos  
Madrid  
e  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
C.S.I.C. – U.A.M.

Panayotis Fantidis Sabbidu, Doctor en Medicina y Cirugía, especialista en Cirugía Cardiovascular y F.E.A. de Cirugía Cardiovascular del Hospital Infanta Cristina de Badajoz y Alberto Muñoz Terol, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid y Profesor Honorario del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICAN: que Doña Arantxa Ortega Pozzi, licenciada en Ciencias Biológicas en la especialidad de Biología celular y molecular, por la Universidad de Alcalá de Henares, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado:

***“Acciones de la hormona adrenocorticotropa sobre la agregación plaquetaria y formación de trombo en la zona de lesión vascular”***

que dicho trabajo ha sido realizado en la Unidad de Medicina y Cirugías Experimentales del Hospital Clínico San Carlos de Madrid y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” y que reúne todas las condiciones requeridas por la legislación vigente, así como la originalidad y calidad científica necesarias, para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, firmamos el presente certificado en Madrid, a 19 de febrero de 2008.

Dr. Panayotis Fantidis Sabbidu

Prof. Alberto Muñoz Terol

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en la Unidad de Medicina y Cirugía Experimentales del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, bajo la dirección del Dr. Panayotis Fantidis Sabbidu a quien quisiera expresar mi más sincero agradecimiento por haberme dado la posibilidad de trabajar con él y desarrollar este trabajo, así como por la formación que me ha ofrecido, mostrándome su apoyo y dedicación a lo largo de todo este período.

Quisiera agradecer al Dr. Alberto Muñoz Terol del Instituto de Investigaciones Biomédicas del C.S.I.C. el haberme aceptado como becaria para poder continuar con mi beca, y su ayuda y consejo a la hora de escribir la Tesis.

Quisiera también expresar mi agradecimiento a Esther Bernardo por su ayuda y consejo en la parte de los experimentos *ex vivo*.

Agradezco también la cooperación que me ha prestado Pablo González en la anestesia y tratamiento de los animales, y el apoyo diario que me han mostrado el resto de mis compañeros.

Por último, agradecer a la Comunidad de Madrid el haberme permitido disfrutar de una beca de formación de personal investigador durante gran parte de este período.

## RESUMEN

El papel de las plaquetas en la trombosis y la relación recíproca existente entre la inflamación y la trombosis están bien establecidas. Los episodios agudos o crónicos de estrés están relacionados con la trombosis arterial y consecuentemente con los síndromes coronarios agudos y el infarto cerebral. Además, el eje hipotálamo-pituitario-adrenal está implicado en la respuesta al estrés y la inflamación. Sin embargo, hasta el momento, no se ha demostrado la posibilidad de que exista trombosis sin inflamación, y se desconoce el papel de las hormonas relacionadas con el estrés, ACTH y cortisol, en la trombosis mediada por plaquetas. En este trabajo demostramos *in vivo* que, si bien el incremento de estas hormonas suprime la inflamación, produce también un aumento de la agregación plaquetaria e induce trombosis. Más aún, demostramos *ex vivo* que la ACTH, pero no el cortisol, puede amplificar la agregación plaquetaria inducida por un agonista fisiológico. Nuestros resultados muestran, por tanto, que la ACTH podría estar implicada en la asociación existente entre los episodios de estrés y la activación plaquetaria, y aportan nuevos puntos de vista sobre su papel en la trombosis aguda.

The role of platelets on thrombosis and the reciprocal relationship between inflammation and thrombosis are well established. Acute or chronic episodes of stress have been associated with arterial thrombosis and subsequent acute coronary syndromes and stroke. Moreover, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is involved in the stress response and inflammation. However, at the moment, the possible existence of thrombosis without inflammation, and the role of the stress-related hormones, ACTH and cortisol on platelet-mediated thrombosis are unclear. In this work, we show that increased availability of these hormones can suppress inflammation and induce thrombosis *in vivo*. Furthermore, ACTH, but not cortisol, can amplify the platelet aggregation induced *ex vivo* by agonists. Our results, therefore, indicate that ACTH may underlie the association between stress and platelet activation, providing new insights into their role in acute thrombosis.

# ÍNDICE

I. <u>CLAVE DE ABREVIATURAS</u>	1
II. <u>INTRODUCCIÓN</u>	3
II.1. SÍNDROMES CORONARIOS AGUDOS	3
- Placas ateroscleróticas vulnerables	4
- Sangre vulnerable	4
- Miocardio vulnerable	5
II.2. EJE ANTIINFLAMATORIO ENDÓGENO	6
- Eje Hipotálamo-pituitario-glándula adrenal	6
- Fisiología de la respuesta al estrés	8
- Patofisiología del eje HPA	9
II.3. RITMOS CIRCADIANOS	10
- Sistema de estrés	11
- Sistema hemostático	12
- Agregación plaquetaria	12
- Factores fibrinolíticos	12
- Variación circadiana de los síndromes coronarios agudos	13
II.4. REACTIVIDAD INDIVIDUAL A LA RESPUESTA AL ESTRÉS: “SUJETOS CON RESPUESTA ELEVADA” Y “SUJETOS CON RESPUESTA BAJA”	14
II.5. PAPEL DE LAS PLAQUETAS EN LOS SÍNDROMES CORONARIOS AGUDOS	16
- Adhesión	16
- Activación	17
- Agregación	18
- Papel de las plaquetas en los SCA	19

III. <u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	21
IV. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	22
IV.1. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	22
- Animales de experimentación	22
- Anestesia	22
- Protocolo de estudio y modelo experimental	23
- Grupo control	23
- Grupo de estudio	25
- Valoración del grado de lesión de la pared vascular y oclusión de la luz del vaso por trombo	27
- Extracción y procesamiento de las muestras de sangre	27
- Análisis de la agregación plaquetaria	28
- Determinaciones bioquímicas	29
- Análisis estadístico	29
IV.2. EXPERIMENTOS <i>EX VIVO</i>	30
- Sujetos de estudio	30
- Extracción y procesamiento de las muestras de sangre	30
- Protocolo de estudio	31
- Análisis del efecto de la ACTH sobre la agregación espontánea y la inducida por agonistas fisiológicos	31
- Evaluación del efecto del bloqueo de los receptores de ADP en la agregación plaquetaria inducida por ADP y/o ACTH	31
- Análisis del efecto del cortisol sobre la agregación espontánea y la inducida por ADP	32
- Determinación de los niveles de AMPc en plaquetas incubadas con ACTH	32
- Determinación de la movilización de calcio intraplaquetario en respuesta a la incubación con ACTH	33
- Evaluación de la activación plaquetaria	34
- Análisis estadístico	34

V. <u>RESULTADOS</u>	36
V.1. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	36
- Grupo control (G1)	36
- Grupo de estudio	37
- Subgrupo G2a	37
- Subgrupo G2b	39
V.2. EXPERIMENTOS <i>EX VIVO</i>	41
- Análisis del efecto de la ACTH sobre la agregación espontánea y la inducida por agonistas fisiológicos	41
- Evaluación del efecto del bloqueo de los receptores de ADP en la agregación plaquetaria inducida por ADP y/o ACTH	44
- Análisis del efecto del cortisol sobre la agregación espontánea y la inducida por ADP	45
- Determinación de los niveles de AMPc en plaquetas incubadas con ACTH	46
- Determinación de la movilización de calcio intraplaquetario en respuesta a la incubación con ACTH	47
- Evaluación de la activación plaquetaria	49
VI. <u>DISCUSIÓN</u>	53
VII. <u>CONCLUSIONES</u>	59
VIII. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	60
VIII.1. PUBLICACIONES EN EL PERÍODO DE TESIS	71



## I. CLAVE DE ABREVIATURAS

AA- Ácido araquidónico.

ACTH- Hormona adrenocorticotropa o corticotropina.

ADP- Adenosina difosfato.

ALRV- Área de luz residual del vaso.

ALVS- Área de luz del vaso sano.

AMPc- Adenosina monofosfato cíclico.

A3P5PS- Adenosina 3'-fosfato 5'-fosfosulfato.

AVP- Arginina vasopresina.

CD40-L- Ligando de CD40.

CD61\*PE- Anti-CD61 conjugado con ficoeritrina.

CRH- Hormona liberadora de corticotropina.

CRP- Proteína C reactiva.

DE- Desviación estándar.

GP- Glicoproteínas.

GR- Receptor de glucocorticoides.

GP IIbIIIa- Complejo glicoproteico IIbIIIa, integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  o receptor de fibrinógeno.

HPA- Hipotálamo-pituitario-glándula adrenal.

HR- "High responders" o sujetos con respuesta elevada.

HSP- Proteína de choque térmico.

IL- Interleuquina.

IRAP- Incremento relativo de la agregación plaquetaria.

LR- "Low responders" o sujetos con respuesta baja.

MC-R- Receptores de melanocortina.

2MeSAMP- 2-metiltioadenosina-5' monofosfato.

MSH- Hormonas estimuladoras de melanocitos.

OR- *Odds Ratio*.

PAI- Inhibidor del activador de plasminógeno.

PARs- Receptores activados por proteasas.

PG- Prostaglandina.

PLC- Fosfolipasa C.

POMC- Proopiomelanocortina.

Ppp- Plasma pobre en plaquetas.

Prp- Plasma rico en plaquetas.

PVN- Núcleo paraventricular.

SCA- Síndromes coronarios agudos.

SNS- Sistema nervioso simpático.

SSA- Sistema simpatoadrenal.

TNF  $\alpha$ - Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ .

t-PA- Activador tisular de plasminógeno.

TxA<sub>2</sub>- Tromboxano A<sub>2</sub>.

vWF- Factor de von Willebrand.

## II. INTRODUCCIÓN

El infarto cerebral y los síndromes coronarios agudos (SCA: infarto de miocardio, muerte súbita isquémica o angina inestable) son una de las primeras causas de mortalidad en países desarrollados. Cada año más de 19 millones de personas experimentan un SCA, y la mayoría de ellos no presentan síntomas previos [86]. Su gran incidencia y su impacto social, sanitario, económico y humano hace que sea uno de los problemas de salud pública de mayor importancia. Por ello, la búsqueda de factores potenciales que puedan inducir la génesis y progresión de la aterosclerosis y la aparición de complicaciones tromboembólicas en las zonas de lesión, centra muchas de las investigaciones en el campo cardiovascular.

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico de la pared arterial, que afecta a la aorta y a las arterias carótidas, coronarias y periféricas [30], y que implica los sistemas vascular, metabólico e inmune [87]. La inflamación está presente en todos los estadios de la enfermedad: formación de estrías grasas, desarrollo de la placa de ateroma, y finalmente, oclusión de los vasos como resultado de una reducción gradual de la luz, o por complicaciones trombóticas bruscas, que pueden dar origen a un SCA. Se ha sugerido que el desarrollo de estas etapas es un proceso largo y silencioso, que en algunos casos, aparece ya en la juventud y permanece asintomático durante muchos años [68].

### II.1. SÍNDROMES CORONARIOS AGUDOS

Los pacientes vulnerables son aquellos sujetos susceptibles de sufrir un SCA o muerte súbita debido a la presencia de placas ateroscleróticas vulnerables, de sangre vulnerable (sangre coagulable) o de miocardio vulnerable (susceptibilidad miocárdica para desarrollar arritmias fatales) [86].

### Placas ateroscleróticas vulnerables

La aterosclerosis se caracteriza por la aparición de lesiones focales en los vasos, que terminan transformándose en placas de ateroma [68]. Los principales componentes de las placas ateroscleróticas son: matriz extracelular de tejido conectivo, incluyendo colágeno, proteoglicanos y fibras elásticas de fibronectina, cristales de colesterol, ésteres de colesterol y fosfolípidos; y células, como los macrófagos derivados de monocitos, células T y células musculares lisas. Estos componentes se encuentran en distintas proporciones, determinando un amplio espectro de lesiones [30].

Diversos factores pueden contribuir a la vulnerabilidad de la placa: inflamación activa, identificable por una extensa acumulación de macrófagos, placas con un núcleo lipídico grande recubierto por una cápsula delgada [66], denudación endotelial con agregación superficial de plaquetas, placas erosionadas o con fisuras [126], estenosis severas [47], nódulos superficiales calcificados [126], placas con hemorragias internas [79], disfunción endotelial [86], o remodelación expansiva [114,124]. Por tanto, la presencia de uno de estos factores o la combinación de varios de ellos, puede suponer un mayor riesgo de sufrir complicaciones en la placa [86].

### Sangre vulnerable

Se caracteriza por el aumento de los niveles circulantes de algunos marcadores de inflamación y de factores procoagulantes, y por disminución de la fibrinólisis.

Algunos marcadores séricos pueden predecir un aumento del riesgo de sufrir SCA, como la proteína C reactiva (CRP) [95,125], niveles circulantes elevados de LDL oxidadas o de colesterol, interleuquina (IL)-6 y otras citoquinas, moléculas de adhesión intracelular solubles [55,56], y otros marcadores de inflamación sistémica como endotoxina bacteriana circulante, proteína de choque térmico (HSP) 60 humana soluble, anticuerpos contra la HSP 65 de micobacterias, *Chlamydia pneumoniae*, o citomegalovirus [64].

El sistema de coagulación-fibrinólisis tiene una gran importancia en la aparición de los SCA, ya que en algunos casos un sistema fibrinolítico activo puede prevenir la trombosis luminal cuando se produce la rotura de la placa [11,75]. Sin embargo, en estados de inflamación, además de promoverse la formación de trombos, puede aumentar la estabilidad del coágulo mediante la inhibición de la fibrinólisis endógena [69].

Los SCA están asociados a condiciones proinflamatorias y protrombóticas que conllevan un incremento prolongado de los niveles de fibrinógeno, CRP, e inhibidor del activador de plasminógeno (PAI) [53,96].

Algunos polimorfismos plaquetarios se han descrito como factores de riesgo del infarto de miocardio, ya que pueden conducir a estados de hipercoagulabilidad. Otras condiciones que conducen a un estado de hipercoagulabilidad son la *diabetes mellitus*, la hipercolesterolemia, y el tabaco. El mecanismo de acción responsable del incremento en las complicaciones trombóticas asociadas con la presencia de estos factores de riesgo vascular puede ser la existencia de niveles elevados de factor tisular circulante [107].

Estudios *post-mortem* realizados en pacientes con SCA, mostraron que la mayoría de los trombos responsables están compuestos por plaquetas o por plaquetas y fibrina [76], y, a menudo, los trombos están constituidos por capas de distinta edad [23]. Dicha composición demuestra que los trombos se forman gradualmente en la sangre en respuesta a estímulos trombogénicos leves y recurrentes, dando lugar a una agregación plaquetaria local que conlleva un período largo de acumulación [102].

### Miocardio vulnerable

Cualquier tipo de daño miocárdico relacionado con la aterosclerosis, como la isquemia, infartos miocárdicos recientes o antiguos, inflamación y/o fibrosis, incrementa potencialmente la vulnerabilidad de los pacientes a las arritmias y la muerte súbita [87]. Sin embargo, existe también un pequeño grupo de pacientes que pueden experimentar arritmias fatales como resultado de enfermedades distintas a la aterosclerosis coronaria. Las distintas formas de cardiomiopatía dan lugar a la mayoría de muertes cardíacas no coronarias [87].

## II.2. EJE ANTIINFLAMATORIO ENDÓGENO

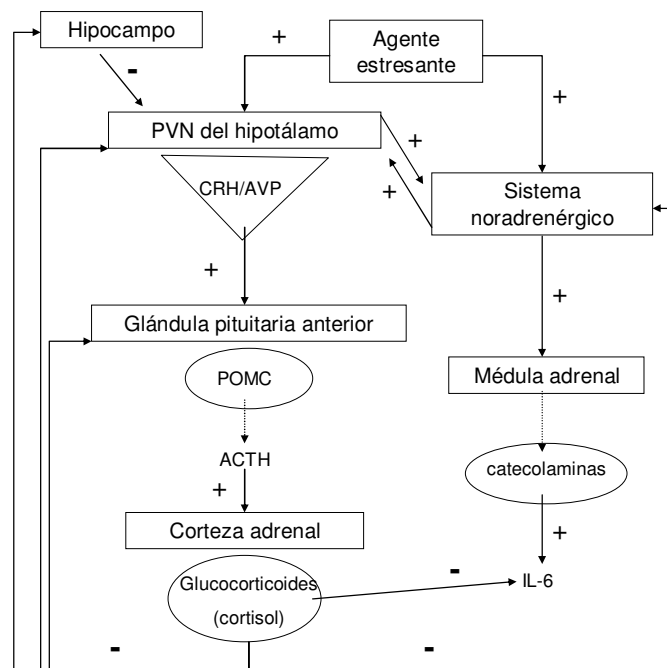
### Eje Hipotálamo-pituitario-glándula adrenal

El eje hipotálamo-pituitario-glándula adrenal (HPA) es considerado el principal sistema antiinflamatorio endógeno del organismo, y es una parte principal del sistema neuroendocrino. Está constituido por el hipotálamo, la glándula pituitaria o hipófisis y la glándula adrenal. Entre estos tres órganos se producen interacciones complejas que permiten llevar a cabo el control de las respuestas al estrés y la inflamación, y regular varios procesos corporales como la digestión, las reacciones del sistema inmune, el humor y la sexualidad, y el balance energético.

La hormona liberadora de corticotropina (CRH) es la principal hormona reguladora del eje HPA, y consecuentemente controla los ritmos diurnos de hormona adrenocorticotropa o corticotropina (ACTH) y glucocorticoides [22,57,61,81]. La liberación de CRH por el hipotálamo está influenciada por el estrés, los niveles sanguíneos de glucocorticoides y los ciclos circadianos.

La CRH es sintetizada por neuronas neuroendocrinas del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo de manera pulsátil [25,51]. Algunas de estas neuronas también sintetizan arginina vasopresina (AVP) [110,127]. Bajo condiciones normales, aproximadamente el 50% de las neuronas de CRH contienen AVP; y el resto contienen únicamente CRH [25,51]. La CRH y la AVP son liberadas por terminales nerviosas en respuesta a una gran variedad de estímulos estresantes [120], y transportadas a la glándula pituitaria anterior a través del sistema sanguíneo portal del tallo hipofisiario. En el lóbulo anterior, estos péptidos actúan sinérgicamente para estimular la secreción de ACTH almacenada en las células corticotropas. La acción sinérgica de estas dos hormonas podría permitir una actuación eficaz y rápida de la pituitaria cuando los niveles circulantes de glucocorticoides son bajos, ya que estos dos neuropéptidos controlan la producción y liberación de ACTH a través de receptores y vías de señalización diferentes [45].

La ACTH es transportada por la sangre hasta la corteza adrenal, donde rápidamente estimula la biosíntesis de corticoesteroides, como los glucocorticoides, a partir del colesterol. La finalidad de la activación del eje HPA es la liberación de glucocorticoides (cortisol en humanos, primates no humanos, cerdo y perro, y corticosterona en roedores) desde la corteza adrenal a la circulación general [51]. A su vez, estos actúan a nivel del hipotálamo y la glándula pituitaria inhibiendo la producción de CRH y ACTH (*Fig. 1*).



*Figura. 1.* Representación esquemática del eje HPA y de su interacción con el sistema de estrés. Las líneas con símbolo (+) representan activación y las líneas con símbolo (-) representan inhibición.

La proopiomelanocortina (POMC) es una proteína precursora que se expresa en el hipotálamo y en la glándula pituitaria, y de la cual derivan las melanocortinas, que son un grupo de hormonas peptídicas que incluyen la ACTH, y las hormonas estimuladoras de melanocitos (MSH)  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ . La señal de la CRH en las células corticotropas incrementa tanto la transcripción del gen de la POMC, como la secreción del péptido maduro de la ACTH [73].

La ACTH y el resto de melanocortinas son reconocidas por 5 subtipos de receptores que tienen distintas afinidades por cada uno de ellos. El receptor de melanocortina 2 (MC2-R) o receptor de ACTH, es un receptor periférico que media los

efectos reguladores de la ACTH en la biosíntesis de corticoesteroides en la glándula adrenal [80]. Los cinco subtipos de receptores de melanocortina, MC<sub>1-5</sub>, están acoplados a proteína-G, dando lugar a la estimulación de la adenil-ciclase y, por tanto, a la producción de AMP cíclico (AMPc) [2].

Los glucocorticoides son hormonas sintetizadas a partir del colesterol, capaces de regular su propia síntesis por mecanismos de regulación negativa. Ejercen su función a través de un receptor específico, el receptor de glucocorticoides (GR). Este receptor está codificado por un único gen que da lugar a dos isoformas, hGR $\alpha$  y hGR $\beta$ , mediante *splicing* alternativo [24].

El incremento de la secreción de glucocorticoides sirve para restringir la producción de mediadores proinflamatorios, y por tanto, para evitar una propagación excesiva de la respuesta al estrés [29]. Los glucocorticoides suprimen la activación de las células inmunes, inhibiendo la producción de citoquinas como la IL-1 $\beta$  y la IL-6, y otros mediadores de inflamación, y produciendo resistencia a las citoquinas. Los glucocorticoides también disminuyen la producción de tres moléculas clave en la respuesta inflamatoria: prostanoïdes, factor activador de plaquetas y el óxido nítrico [17].

La respuesta fisiológica y la sensibilidad a los glucocorticoides dependen principalmente de sus receptores, y pueden variar entre especies, individuos, tejidos, tipos celulares e incluso durante las distintas fases del ciclo celular [54,71].

### Fisiología de la respuesta al estrés

Cualquier alteración de la homeostasis o equilibrio dinámico del organismo es definido como estrés, y las causas desencadenantes de dicho desequilibrio se denominan agentes estresantes [19]. La activación del sistema de estrés implica cambios nerviosos y endocrinos conocidos como “respuesta al estrés”, destinados a adaptar y mejorar la capacidad del organismo a restablecer la homeostasis y garantizar la supervivencia [119]. Las principales respuestas del organismo ante situaciones de estrés están generadas y controladas por un intrincado sistema, que incluye el sistema simpatoadrenal (SSA) y el eje HPA, los cuales conectan el cerebro con la periferia del cuerpo [19]. El SSA está compuesto por el sistema nervioso simpático (SNS) y por la



médula adrenal [16]. El sistema límbico del cerebro, particularmente el hipocampo y la amígdala, está también íntimamente implicado en las respuestas al estrés [123].

Cuando el cuerpo está en reposo el sistema de estrés está activo, respondiendo a diversas señales circadianas, neurosensoriales y sanguíneas. Estas señales incluyen citoquinas producidas por reacciones inmunes mediadas por inflamación como el factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , la IL-1 o la IL-6 [15,19,109]. Las citoquinas proinflamatorias que se liberan en respuesta a un estímulo inmune producen una marcada activación del eje HPA [26,59] que resulta en un aumento de la secreción de glucocorticoides, los cuales juegan un papel crítico en atenuar la respuesta inmune [59].

La activación del sistema de estrés produce excitación, acelera los reflejos motores, mejora la atención y la función cognitiva, disminuye el apetito y la excitación sexual, e incrementa la tolerancia al dolor [15,19]. También modifica la función cardiovascular y el metabolismo, e inhibe la inflamación [17].

### Patofisiología del eje HPA

Generalmente, la activación del eje HPA en respuesta a un episodio de estrés es aguda y transitoria. Esta naturaleza limitada tiene efectos inmunosupresivos beneficiosos de carácter temporal [119]. Sin embargo, el sistema de regulación negativa del cortisol puede estar dañado en individuos con estrés crónico emocional o físico, y puede alterarse también con la edad [18,49,65,122]: desarreglos del eje HPA, causados por la carga acumulada de estímulos ambientales estresantes repetidos o crónicos, contribuyen al desarrollo de diversas enfermedades [123].

La secreción en exceso sostenida de cortisol se ha asociado con depresión, hipertensión, osteoporosis, inmunosupresión y todo el espectro metabólico del síndrome X, incluyendo obesidad visceral, resistencia a la insulina, dislipidemia, discoagulación, e hipertensión, además de influir en la progresión de la aterosclerosis [18,33,118]. Desarreglos menos severos del eje también pueden tener consecuencias adversas en la salud. Tanto la hipersecreción normal de cortisol debida al estrés diario como la hipersensibilidad a los glucocorticoides limitada a los tejidos, puede afectar a parámetros fisiológicos importantes como la presión sistémica sanguínea, o funciones como el metabolismo de lípidos y carbohidratos, con efectos deletéreos potenciales en el organismo a largo plazo [94,101].

### II.3. RITMOS CIRCADIANOS

La organización temporal de un ser vivo está influida por la reacción a los estímulos ambientales y por los relojes internos. Esta segunda forma proporciona modificaciones fisiológicas cíclicas en el período entre el día y la noche y está determinada de manera endógena en todos los seres vivos [52].

El control de este mecanismo está más desarrollado en mamíferos debido a que tiene lugar en el eje HPA. Está íntimamente relacionado con el sistema neuroendocrino y tiene una gran influencia en otras partes del organismo [52]. De hecho, se ha demostrado que el sistema cardiovascular está sometido a ritmos circadianos, observándose una mayor incidencia de eventos cardíacos por la mañana [83,131]. Posiblemente, esta mayor incidencia matutina se deba, por un lado, al aumento de la agregación plaquetaria [116] acompañado por una acción antagonista insuficiente del sistema fibrinolítico endógeno a primeras horas de la mañana, que pueden producir un estado de relativa hipercoagulabilidad [121]. Y, por otro lado, a que en este período matinal se produce un aumento de la presión arterial [78], la frecuencia cardíaca [88], la secreción de catecolaminas [129], el tono simpático [84], y los valores plasmáticos de ACTH y, consecuentemente, de cortisol [85], pudiendo por tanto actuar sobre la placa vulnerable de ateroma. Aunque estos procesos fisiológicos, que actuarían como desencadenantes de los SCA, pueden producirse también en otras horas del día, la mayor frecuencia matinal podría explicarse por su sincronismo [52]. Otra explicación podría ser que el aumento de los eventos cardiovasculares por la mañana se deba principalmente al hecho de levantarse y comenzar las actividades diarias, más que al momento del día en sí mismo. De hecho, según algunos estudios, la frecuencia máxima de aparición del infarto de miocardio y la muerte cardíaca súbita se produce en las tres primeras horas después de levantarse, independientemente de la hora del día en que esto ocurra [82].

## Sistema de estrés

La ACTH presenta un ritmo circadiano caracterizado por niveles máximos entre las 6 y las 9 horas de la mañana. La concentración de cortisol plasmático responde a las variaciones de la concentración plasmática de ACTH, de modo que se encuentran niveles de secreción de cortisol máximos a primeras horas de la mañana, al despertarse, los cuales descienden hasta valores próximos a cero al acostarse. La mitad de la concentración de cortisol que es liberada durante el día se secreta en el período antes del amanecer, momento en el cual también se produce activación simpática [52].

Todas las catecolaminas siguen el mismo patrón circadiano. Al despertar, el organismo pasa por una situación de estrés debido a la rápida transición de un estado de bajo metabolismo a un estado de metabolismo más alto, para lo cual se necesita una respuesta neuroendocrina adecuada [63]. De esta forma, se produce un aumento inicial de la secreción de catecolaminas con el fin de ajustar el sistema cardiovascular a la nueva situación. Debido a esta necesidad, durante las horas en que el individuo permanece despierto, la concentración plasmática de catecolaminas se mantiene más elevada. Aún así, la concentración plasmática de catecolaminas no permanece constante a lo largo del día, variando considerablemente en función de las necesidades metabólicas y presentando niveles máximos en las primeras horas de la mañana [52]. Diversos estudios han demostrado que los niveles plasmáticos de noradrenalina aumentan aproximadamente el 50% cuando los sujetos cambian de postura supina a una postura erecta, independientemente del momento del día [130].

La monitorización continua de la presión arterial a lo largo del día, ha permitido observar valores mayores durante el día, con una meseta desde las 6 hasta las 18 horas [78]. A partir de esta hora, la presión arterial desciende de forma continua durante la noche para alcanzar los valores mínimos sobre la media noche o después de que el individuo se va a dormir. Durante las primeras horas de la madrugada, estos valores vuelven a aumentar lentamente, hasta aproximadamente las 5 de la mañana. Al despertar y adoptar la postura erecta se produce un aumento brusco y acentuado de los valores de la presión arterial [52].

La frecuencia cardíaca sufre un aumento brusco durante la mañana, hasta alcanzar niveles máximos alrededor del mediodía, cayendo entonces de manera progresiva hasta llegar al mínimo aproximadamente a las 4 de la madrugada, y volviendo a aumentar posteriormente después de despertar [52].

## Sistema hemostático

El sistema hemostático incluye plaquetas, proteínas de coagulación, inhibidores de coagulación y proteínas fibrinolíticas, que generalmente están en equilibrio. Este balance sigue un patrón circadiano de 24 horas, con un incremento de la reactividad plaquetaria y una disminución de la fibrinólisis por la mañana [99].

### *Agregación plaquetaria*

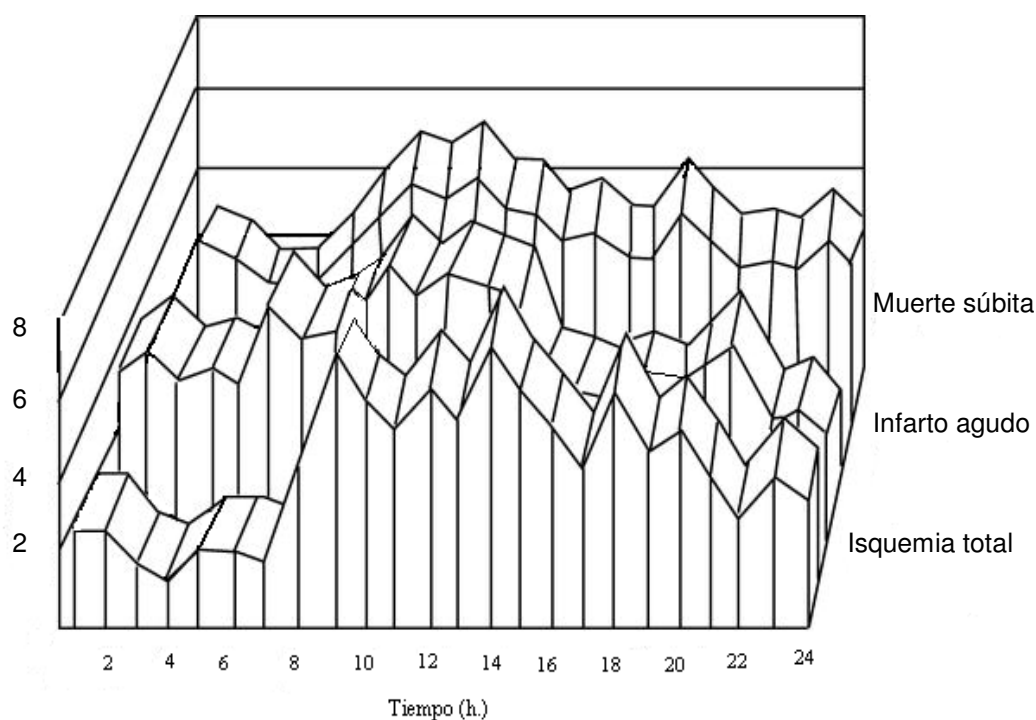
Se ha observado un incremento significativo de la agregación plaquetaria íntimamente asociado con las concentraciones plasmáticas de adrenalina y noradrenalina, que alcanza los niveles máximos entre las 6 y las 9 horas de la mañana. Este aumento matutino de la agregación se debe, por un lado, a algunos componentes intrínsecos del proceso de despertar y asumir la posición erecta del cuerpo, un proceso acompañado por la activación del SNS [116]. Sin embargo, la cantidad de adrenalina y ADP necesaria para inducir la agregación plaquetaria en el período comprendido entre las 6.30 y las 11.00 horas, es menor que a otra hora del día, y, por tanto, parece que además existe un aumento de agregabilidad en este período del día [116].

### *Factores fibrinolíticos*

La actividad plasmática del activador tisular de plasminógeno (t-PA) y del PAI-1, que puede ser modificada por el estrés, sufre una fluctuación circadiana. En individuos sanos, los valores de la actividad del PAI-1 alcanzan su máxima concentración entre las 24 y las 6 horas de la mañana, mientras que sus valores más bajos se observan alrededor de las 6 de la tarde. Por el contrario, los valores de la actividad del t-PA alcanzan su máxima concentración sobre las 6 de la tarde y los valores mínimos entre la media noche y las 6 de la mañana [100]. Esto hace que por la mañana exista una mayor probabilidad de que ocurra una obstrucción trombótica vascular, facilitando la aparición de accidentes isquémicos cardiovasculares [4].

### Variación circadiana de los síndromes coronarios agudos

Se ha comprobado que los episodios isquémicos tienen una mayor frecuencia en las primeras horas de la mañana. Estos episodios comienzan alrededor de las 8, alcanzando una meseta hacia las 13 horas, y disminuyen gradualmente a continuación. El menor número de episodios isquémicos tiene lugar durante la noche (*Fig. 2*), de hecho, existe un riesgo de sufrir un infarto de miocardio tres veces mayor durante las horas comprendidas entre las 7 y las 12 horas de la mañana que de madrugada [52], y el riesgo de sufrir muerte cardíaca súbita entre las 7 y las 9 horas de la mañana es un 70% mayor que en otras horas del día [128]. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la prevención de estos eventos por la mañana disminuiría sólo una porción del total de SCA, ya que, aunque están principalmente concentrados en las primeras horas del día, la mayoría se producen en otras horas del período diurno [52], y que algunos factores de riesgo cardiovascular pueden modificar este patrón circadiano [72].



*Figura 2.* Distribución de los episodios cardíacos [52].

#### II.4. REACTIVIDAD INDIVIDUAL A LA RESPUESTA AL ESTRÉS: “SUJETOS CON RESPUESTA ELEVADA” Y “SUJETOS CON RESPUESTA BAJA”

La investigación de la respuesta neuroendocrina al estrés es de gran importancia, ya que se ha observado una fuerte asociación entre el estrés y la enfermedad coronario-cardíaca [48,112]. Los procesos relacionados con el estrés pueden contribuir a desencadenar los SCA en pacientes con una enfermedad coronaria establecida [104,115].

Factores emocionales negativos como depresión, desórdenes de ansiedad, hostilidad o ira, y el estrés crónico producido por situaciones como bajo soporte social, bajo estatus socioeconómico, estrés en el trabajo, estrés marital o la carga de tener que cuidar a un enfermo o persona discapacitada, pueden originar el desarrollo de aterosclerosis o la aparición de eventos cardíacos [105]. El estrés psicológico está asociado con la disfunción del endotelio coronario [34,44], que es una de las bases de la aparición del proceso aterosclerótico [102], así como con trastornos en la coagulación [77,92] y con la activación del SNS, con el consecuente aumento de la producción de catecolaminas. Existen muchos estudios que demuestran la relación entre los factores psicológicos y el comienzo y pronóstico de los SCA. Tanto el estrés psicológico como el ejercicio extenuante incrementan la frecuencia cardíaca y la presión sanguínea, la combinación de estos dos agentes estresantes puede incrementar las respuestas cardiovasculares en hombres [103].

Por otro lado, se ha comprobado que personas con un buen soporte social tienen un menor aumento de la frecuencia cardíaca y la presión sanguínea durante pruebas de estrés mental realizadas en el laboratorio [43], y que emociones positivas pueden mejorar la función inmune [20]. Además se ha observado, una estrecha relación entre niveles de optimismo altos y consecuencias cardíacas favorables [111].

También existen diversos estudios que relacionan el estrés agudo con el desarrollo de la enfermedad cardíaca. El estrés agudo estimula el SNS dando lugar a gran variedad de efectos, como el aumento de la frecuencia cardíaca, la presión sanguínea, y determinantes de la viscosidad sanguínea (hematocrito, niveles de fibrinógeno), o efectos directos sobre el endotelio vascular coronario. Las consecuencias clínicas de estos efectos incluyen el desarrollo de isquemia de miocardio, arritmias cardíacas y el aumento de la vulnerabilidad de las placas coronarias y cambios hemostáticos. Estos cambios actúan de base para el desarrollo del infarto agudo de

miocardio y muerte súbita cardíaca, y pueden persistir durante semanas tras un simple evento estresante [105].

La predisposición genética puede influir la naturaleza de la respuesta de los individuos al estrés y la probabilidad de la exposición a eventos estresantes [1]. Por tanto, la respuesta al estrés es variable de unos individuos a otros, siendo en muchos casos bimodal [89]. Por ello, en la mayoría de los casos, las poblaciones de estudio se separan en patrones dicotómicos de acuerdo a la intensidad de la respuesta individual a un ensayo determinado, pudiendo ser “sujetos con respuesta elevada” (“high responders”, HR) y “sujetos con respuesta baja” (“low responders”, LR). Aproximadamente un tercio de la población muestral de individuos sanos son HR, y presentan una respuesta de cortisol exagerada en las pruebas de estrés psicológico. De forma similar, un tercio de la población muestral de sujetos sanos tiene una respuesta neuroendocrina exagerada al ejercicio extenuante [98]. Estos HR muestran respuestas de ACTH, cortisol y AVP al ejercicio significativamente incrementadas respecto de los LR [97,98]. Singh *et al.* demostraron que los hombres que son HR respecto al estrés físico, también lo son para el estrés psicológico [113].

Las respuestas adrenocorticales en los HR son significativamente superiores que en los LR, independientemente del agente estresante que se haya tenido en cuenta. Sin embargo, ambos grupos tienen respuestas de adrenalina y noradrenalina similares al mismo agente estresante psicológico. Esto puede indicar que los mecanismos que conllevan a una reactividad al estrés distinta entre HR y LR del componente adrenocortical no actúan del mismo modo en cuanto a la activación simpática [89].

Todavía no se conoce bien el mecanismo responsable de las diferencias observadas en los patrones de activación neuroendocrina, pero hay hipótesis que señalan que el eje HPA es inherentemente más activo en los HR que en los LR, lo que implica que la corteza adrenal podría ser ligeramente mayor en los HR. Esta diferencia del tamaño de la corteza adrenal puede deberse a la existencia de niveles de ACTH ligeramente superiores, y también a una actividad adrenomedular incrementada, que da lugar a la producción de sustancias sinérgicas con la ACTH en la estimulación de la función y del crecimiento cortical [8,113].

## II.5. PAPEL DE LAS PLAQUETAS EN LOS SÍNDROMES CORONARIOS AGUDOS

En condiciones fisiológicas, las plaquetas, junto con el endotelio y factores de coagulación plasmáticos, contribuyen al balance hemostático, proceso mediante el cual mantienen la integridad vascular en ausencia de daño vascular y protegen al organismo contra hemorragias espontáneas.

Acciones traumáticas con daño vascular permiten la salida de la sangre a los tejidos cercanos. Para evitarlo, las plaquetas, en combinación con otros componentes solubles del plasma, forman trombos hemostáticos que reparan el daño de la pared del vaso sanguíneo y detienen la hemorragia. En condiciones fisiológicas, la formación del trombo hemostático se limita a la región vascular dañada, sin efectos negativos en el flujo sanguíneo [39].

La formación del trombo de la pared del vaso se realiza en tres etapas: hemostasis primaria, hemostasis secundaria y fibrinólisis. El principal desencadenante de la formación del trombo hemostático primario tras el daño vascular es la pérdida de la barrera de células endoteliales que hay entre los componentes de la matriz extracelular y el flujo sanguíneo. La respuesta de las plaquetas a este hecho se desarrolla en tres fases sucesivas: adhesión, activación y agregación para dar lugar a un trombo rico en plaquetas (trombo blanco), que detiene temporalmente la hemorragia [106]. Tras la activación de la cascada de coagulación se forma un trombo rico en fibrina (trombo rojo) durante la hemostasis secundaria, el cual es más estable y permite que comience a repararse la región vascular dañada. Durante este proceso de reparación, el trombo hemostático secundario va siendo degradado por el sistema fibrinolítico [39].

### *Adhesión*

Dependiendo de la profundidad del daño vascular, los trombocitos entran en contacto con diferentes constituyentes de la membrana y de la matriz extracelular como fibronectina, fibulina, laminina, factor de von Willebrand (vWF) y distintos tipos de colágeno, que quedan expuestos a la circulación sanguínea tras la rotura superficial del endotelio. Las plaquetas contienen receptores de membrana independientes de la activación, lo que les permite en pocos segundos, formar una monocapa de plaquetas firmemente unidas al área de lesión. [40,106].



Hay dos glicoproteínas (GP) de la membrana trombocítica que interaccionan directamente con el colágeno, la integrina  $\alpha_2\beta_1$  (también llamada GP IaIIa) y la GP VI, que son responsables de la activación y cambio conformacional de las plaquetas adheridas. Sin embargo, los receptores de colágeno no pueden iniciar y propagar la formación del trombo en condiciones de flujo sanguíneo alto, a menos que las plaquetas hayan sido previamente ancladas a la superficie a través de la interacción entre el vWF unido a colágeno y la GP Ib $\alpha$ , de hecho esta unión es imprescindible para el proceso normal de adhesión [106]. La unión vWF-GP Ib $\alpha$  también es necesaria para una correcta adhesión de la fibronectina a las plaquetas [6]: la interacción sinérgica entre estos dos sustratos adhesivos también contribuye al inicio de la formación de trombo (*Fig. 3*).

La fibulina puede unirse a fibronectina [5] y a fibrinógeno [117]. Particularmente, la unión del fibrinógeno a la fibulina puede incrementar la habilidad de promover la adhesión y la formación del trombo [46].

### *Activación*

Los estímulos originados por las interacciones de adhesión iniciales, y por los agonistas generados o liberados en la zona de lesión, actúan como una red de señalización que estimula en pocos segundos las propiedades adhesivas y procoagulantes de las plaquetas ancladas a la lesión o que circulan en la proximidad [108].

La unión de ligandos adhesivos y agonistas a sus receptores en la membrana de la plaqueta produce el inicio de la fase de activación, que se propaga mediante reacciones de señalización intracelulares, en las cuales están involucradas enzimas, sustratos y cofactores (*Fig. 3*). La activación tiene lugar bajo un estrecho control negativo, llevado a cabo por sustancias inhibitoras como la prostaciclina y el óxido nítrico, que contribuyen a limitar la formación del trombo dentro de los alrededores de la lesión de la pared vascular. Los principales inductores de la activación plaquetaria son el colágeno y el vWF entre los sustratos adhesivos, la trombina  $\alpha$  generada en la membrana de las plaquetas estimuladas, el ADP liberado por las células vasculares y las plaquetas estimuladas, la epinefrina y el tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) [106].

La trombina  $\alpha$  estimula las plaquetas a través de receptores activados por proteasas (PARs) unidos a proteína G, los cuales intervienen en las respuestas ligadas a G $\alpha_q$ , que conducen a la activación de la fosfolipasa C $\beta$  (PLC), y esta a su vez contribuye

a la movilización de calcio a partir de reservorios internos, y a la activación de la proteína quinasa C. El incremento de calcio intracelular regula varios mecanismos que conducen a la agregación plaquetaria, incluyendo la activación de la fosfolipasa  $A_2$ , que conlleva la producción de ácido araquidónico (AA) y la síntesis de  $TxA_2$ . Este, además de ser inductor de la activación plaquetaria, tiene propiedades vasoconstrictoras y favorece la formación del trombo, ya que disminuye el flujo sanguíneo [40,106].

El ADP es un agonista leve, cuya acción directa sólo induce el cambio conformacional y la agregación reversible de las plaquetas. Sin embargo, el ADP también induce la síntesis de  $TxA_2$ , que produce agregación secundaria, y, además, es esencial en la función plaquetaria, ya que una vez secretado por los gránulos densos amplifica la respuesta inducida por otros agonistas. El ADP actúa a través de dos receptores de la membrana de las plaquetas, el receptor  $P2Y_1$  acoplado a  $G\alpha_q$ , que produce un aumento transitorio de calcio citosólico libre, y el receptor  $P2Y_{12}$  acoplado a  $G\alpha_i$ , que inhibe la adenilato-ciclase, enzima responsable de la producción de AMPc que es inhibidor de la función plaquetaria [106] (*Fig. 3*). La estimulación normal de la agregación inducida por ADP necesita la acción concomitante de ambas vías de activación,  $G\alpha_q$  y  $G\alpha_i$  [36].

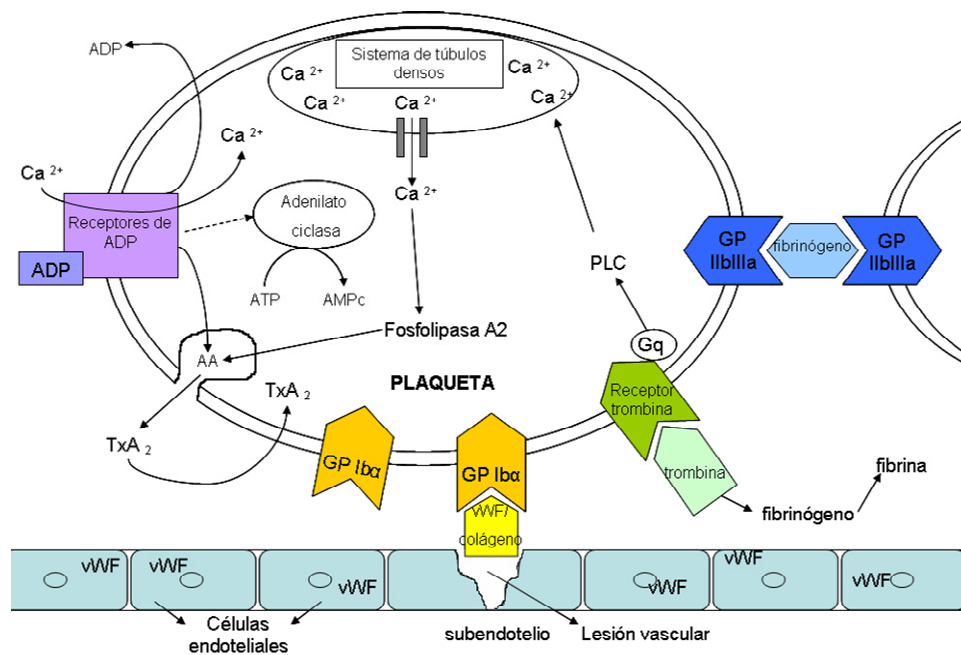
Las manifestaciones fenotípicas normales de la activación plaquetaria incluyen polimerización de actina, con reorganización del citoesqueleto y el subsiguiente cambio morfológico, secreción de los gránulos trombocíticos y agregación dependiente de la modulación de ligandos solubles que se unen al receptor GP IIb/IIIa (también llamado integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ). La secreción conduce a la liberación de los componentes de los gránulos al citoplasma (iones de calcio) y al espacio extracelular (vWF, factores de crecimiento y nucleótidos), y redistribución de proteínas en la superficie celular (P-selectina). Todos estos eventos incrementan la activación y la agregación [106].

La acción procoagulante de las plaquetas activadas conduce a la generación de trombina y facilita el depósito de fibrina en el interior de los agregados, lo que contribuye a dar estabilidad al trombo hemostático [106] (*Fig. 3*).

### *Agregación*

Durante la adhesión y la activación se liberan los componentes de los gránulos trombocíticos, lo que refuerza el proceso mediante mecanismos autocrinos y paracrinos, a través de la estimulación y reclutamiento de plaquetas circulantes, induciéndolas a adherirse a las plaquetas ya ancladas a la pared del vaso. La interacción de las plaquetas

circulantes con las plaquetas ya adheridas se realiza a través de la integrina  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  activada [40], mediante la movilización de proteínas adhesivas solubles como el vWF, el fibrinógeno o la fibronectina, hacia la superficie de las plaquetas adheridas [106] (*Fig. 3*).



*Figura 3.* Esquema de la unión de receptores de membrana plaquetarios a factores extracelulares en respuesta a la activación [13,40].

### Papel de las plaquetas en los SCA

La base patofisiológica de los SCA es la rotura de la placa con la subsiguiente agregación de plaquetas y formación de trombo [41]. Además de producir oclusiones vasculares trombóticas, las plaquetas participan en la microembolización y vasoconstricción, en la progresión de la placa, y en reacciones inflamatorias sistémicas, mecanismos que parecen influir decisivamente en el pronóstico de los SCA [93].

Recientemente se ha descrito, que el ligando de CD40 (CD40-L), expresado en la superficie de las plaquetas activadas, está involucrado en el reclutamiento de plaquetas mediado por la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Esto podría determinar el tamaño y estabilidad del trombo, y si este puede llegar a ocluir una arteria [3]. El CD40-L también está

involucrado en la patogénesis de la aterosclerosis, y puede representar un enlace entre las plaquetas y el desarrollo de las placas ateroscleróticas [38].

A parte de su importancia en la formación de trombos, las plaquetas activadas tienen actividad proinflamatoria, ya que inducen en las células endoteliales la producción de citoquinas como la IL-8 o la IL-6, mediadores importantes de la reacción inflamatoria sistémica. Las plaquetas activadas se unen a los leucocitos circulantes activándolos, y habiéndose observado un incremento del número de agregados plaqueta-leucocito circulantes en pacientes con angina inestable e infarto de miocardio [90]. Esta interacción entre leucocitos y plaquetas se realiza a través de la P-selectina. También se ha encontrado un aumento de la proporción de plaquetas que expresan esta selectina en la superficie celular, y un aumento de la forma soluble de esta molécula en plasma en pacientes con SCA en comparación con individuos sanos o pacientes con angina inestable. Así mismo, se ha observado un incremento del número de agregados plaqueta-monocito durante las primeras 4 horas del comienzo de los síntomas en pacientes con infarto agudo de miocardio [10]. La unión de las plaquetas estimula la producción de factor tisular y metaloproteinasas por los monocitos/macrófagos activados. Igualmente, esta unión promueve la formación y el depósito de fibrina en el trombo en crecimiento, proceso que se ve acelerado por el factor tisular expresado por los monocitos a través de la interacción con la P-selectina de las plaquetas [32].

El objetivo primario de una terapia antitrombótica eficaz en los SCA es prevenir, o al menos limitar, la formación de trombos intravasales y por tanto, prevenir o limitar la oclusión vascular. Al mismo tiempo, la terapia antiplaquetaria puede influir sobre la vasoconstricción y la embolia dependientes de las plaquetas, y por tanto mejorar la circulación periférica dañada y la reacción inflamatoria sistémica [41].

### III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A la vista del importante papel que juegan las plaquetas en la formación de trombos y, consecuentemente, en los SCA y el infarto cerebral; y dado que los SCA han sido asociados con situaciones de estrés, y en la regulación de la respuesta al estrés juega un importante papel el eje HPA, nos planteamos la hipótesis de que las dos hormonas circulantes del eje HPA, ACTH y cortisol, podrían estar directamente implicadas en la formación de trombos en las zonas de lesión vascular y en el subsiguiente desencadenamiento de estos síndromes.

El objetivo del presente estudio es analizar los efectos de la modulación de los niveles circulantes de ACTH y cortisol, sobre la formación de trombos en la zona de lesión vascular, y evaluar los posibles mecanismos de acción de estas hormonas en la agregación plaquetaria. Para ello, estudiaremos *in vivo*, en animales de experimentación (cerdos), la influencia de la modulación de estas hormonas sobre la agregación plaquetaria, en presencia o ausencia de lesión vascular. Además, se estudiará *ex vivo*, en sangre de individuos humanos sanos, los mecanismos de acción de estas dos hormonas en la agregación plaquetaria y formación de trombo.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### IV.1. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

#### Animales de experimentación

Se emplearon un total de 38 cerdos domésticos de raza Pietrain (21 hembras/ 17 machos), con un peso medio de  $37,4 \pm 9,3$  kg (Granja Cunicula. San Bernardo S.L.). A su llegada, los animales fueron alojados en habitáculos de cuarentena durante cinco días y, posteriormente, en jaulas con un ambiente controlado de luz/oscuridad (12 horas/12 horas con una intensidad de luz de 300 a 510 Lux), temperatura (18-24°C) y de humedad relativa (50-55%). Se les administró comida y agua *ad libitum*.

Los animales fueron tratados y anestesiados de acuerdo con el Real Decreto 223/1988 de 14 de marzo, sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE 1988;Nº67;8509-8512). Con anterioridad al inicio de los experimentos, se envió el protocolo experimental a la Sección de Protección animal de la Dirección General de Agricultura de la Comunidad de Madrid.

#### Anestesia

Doce horas antes del experimento los animales no tuvieron acceso a la comida pero sí al agua. La preanestesia se indujo con una combinación de 20 mg/kg de ketamina (Ketolar<sup>R</sup> Hidrocloruro de 2-(O-clorofenil)-2-metilaminocicloxanona, viales de 50 mg/ml. Pfizer Ireland Pharmaceuticals, County Dublin, Irlanda) y 0,02 mg/kg de atropina (Sulfato de Atropina, 1 mg/ml. B Braun Medical S.A., Rubi, Barcelona, España) administrada intramuscularmente en la extremidad posterior del animal.

A continuación, mientras los animales se encontraban en respiración espontánea, se les administró oxígeno al 100% con una máscara de Hall, y se les indujo la anestesia con una combinación de 6 mg/kg de Propofol (Propofol 1% Fresenius. Fresenius Kabi Austria GmbH, Graz, Austria), 5 cc de besilato de atracurio (Tracrium<sup>R</sup>, 5 ml. Glaxo SmithKline, S.p.A. S. Polo di Torrile, Parma, Italia) y 1 µg/kg de fentanilo (Fentanest<sup>R</sup>, ampollas de 0,15 mg/3ml. Kern Pharma, S.L., Terrassa, Barcelona, España) por vía intravenosa. La intubación endotraqueal se realizó con ayuda de un laringoscopio de

pala plana para levantar la epiglotis e introducir un tubo endotraqueal (6,0 mm ID, 6,8 mm OD, y balón de 22 mm, Hi-Contour<sup>TM</sup>. Tyco Healthcare. Hampshire, Reino Unido). Una vez colocado el tubo en la traquea, se hinchó el balón para fijar el tubo, y se conectó a un equipo de ventilación (respirador volumétrico Datex Ohmeda Aestiva 5. Somatechnology inc. Cheshire, USA).

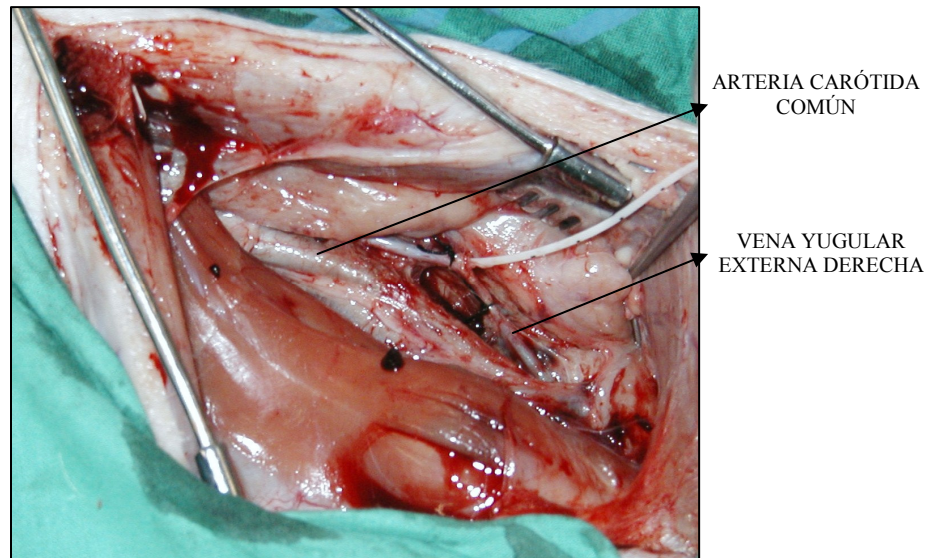
Tras la intubación endotraqueal, la anestesia se mantuvo con una mezcla de gases: oxígeno al 1%, óxido nitroso al 2%, e isoflurano al 2% (Forane<sup>R</sup>, líquido inhalatorio. Abbott Laboratories Ltd., Queenboroug, Kent, Inglaterra), y se monitorizó continuamente la saturación de oxígeno (99%), el volumen de CO<sub>2</sub> expirado (30-35), la presión sistémica, y el electrocardiograma.

#### Protocolo de estudio y modelo experimental

La dificultad de las técnicas quirúrgicas empleadas, que exigen una especialización y experiencia más allá de la adquirible y exigible a una estudiante de doctorado sin estudios de medicina, ha aconsejado su realización de modo preferente por el Director de esta Tesis, Dr. Fantidis.

#### *Grupo control (G1)*

En el grupo de animales control (n = 18) se evaluó la producción de las variables bioquímicas objeto de nuestro trabajo (cortisol e IL-6) y la agregación plaquetaria, antes y después de causar la lesión vascular y posterior formación de trombo en la zona lesionada. Los valores de las variables de este grupo de animales se tomaron como referencia para compararlos con los valores de las variables obtenidas en los grupos sucesivos de estudio.



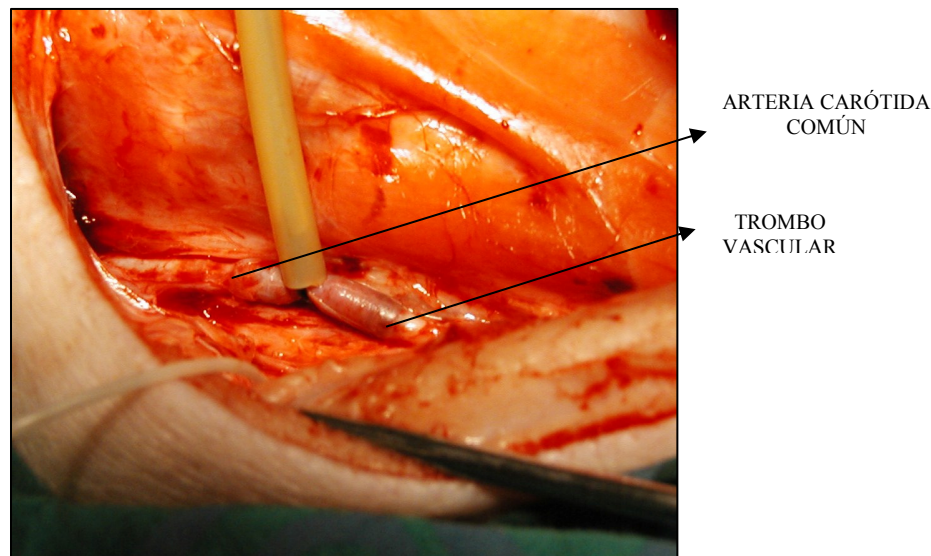
*Figura 1.* Disección de la vena yugular y la arteria cárotida antes de realizar la lesión del vaso.

Tras la estabilización hemodinámica, se realizó la disección de la vena yugular externa derecha y la arteria carótida común homolateral, y se procedió a la canulación de la vena yugular, para la recogida de muestras de sangre (*Fig. 1*). Se realizó una extracción de sangre inmediatamente antes de efectuar la lesión vascular (muestras basales).

Posteriormente, se realizó la lesión de la pared del vaso, efectuando la denudación del endotelio vascular y rotura de las láminas elásticas. Para ello, se realizaron cuatro o cinco clampajes externos con una abrazadera quirúrgica traumática, según un modelo previamente descrito [31]. La lesión, de unos 2 cm de longitud, fue causada en la parte media de la arteria carótida derecha común. El tiempo de oclusión de la arteria carótida fue continuamente monitorizado. Para ello, se controló y midió la presión distal al segmento lesionado y el sistema de presión se sometió a lavados periódicos durante todo el experimento. Cuando la curva de presión distal a la zona de lesión perdía su morfología habitual, convirtiéndose en plana, y, si tras 2 ó 3 lavados la curva permanecía plana, se consideró que la arteria carótida común se encontraba ocluida por la formación de trombo en el segmento lesionado (*Fig. 2*). Además, la estimación del grado de oclusión del vaso se hizo por escopia, empleando un aparato de RX (Philips Medical Systems Ibérica. Madrid, España) e inyectando selectivamente contraste radiopaco por la parte proximal de la arteria carótida, y, posteriormente, por



histomorfometría. Una vez realizada la lesión se tomaron muestras de sangre a los 20, 40 y 120 minutos (*Fig. 3A*).



*Figura 2.* Arteria carótida común homolateral trombosada.

A los 120 minutos de realizar la lesión, el experimento se dio por finalizado. Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de tiopental sódico (Tiobarbital BRAUM<sup>R</sup>, 1g. B Braum Medical S.A., Rubí, Barcelona, España) por vía intravenosa. Las arterias carótidas fueron seccionadas e incluidas en formol (3,7-4% peso/volumen) durante al menos 24 horas, y, posteriormente, fueron seccionadas en anillos e incluidas en parafina y teñidas con tinciones estándar (hematoxilina y eosina, tricrómico de Masson y orceína), para el estudio con microscopía óptica.

#### *Grupo de estudio (n = 20)*

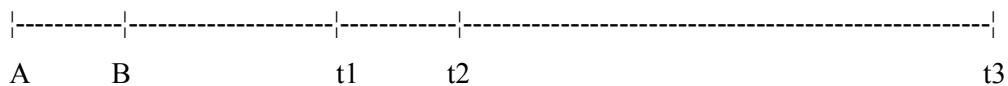
A diferencia del grupo control, inmediatamente después de efectuar la extracción de la muestra basal de sangre se administró a cada animal 0,5 mg (0,125  $\mu$ M) de ACTH (Nuvacthén<sup>R</sup> Depot, 1mg/ml. Novartis Pharma, S.A., Rueil, Malmaison, Francia) intramuscularmente, para aumentar los niveles circulantes de ACTH y, consecuentemente, de cortisol. La dosis de tratamiento se fijó basándonos en la dosis media recomendada en niños. Este grupo de cerdos se dividió en dos subgrupos:

Subgrupo 2a (G2a, n = 10). Se evaluó el efecto del aumento de los niveles circulantes de ACTH y cortisol sobre las variables analizadas, en animales con lesión vascular. Tras una hora de administrar la ACTH, se extrajo

una nueva muestra de sangre, e, inmediatamente después, se procedió a realizar la lesión vascular. Posteriormente, se tomaron muestras sanguíneas a los 20, 40 y 120 minutos de lesionar la arteria (*Fig. 3B*).

Subgrupo 2b (G2b, n = 10). A diferencia del G2a, se valoró el efecto del aumento de los niveles circulantes de ACTH y cortisol en las variables del estudio en ausencia de lesión vascular. Después de la extracción de la muestra basal de sangre, se suministró ACTH, y, a continuación, se tomaron muestras a los 20, 40, 60, 90, 120 y 180 minutos, para hacer un seguimiento de las variables de nuestro trabajo (*Fig. 3C*).

#### A. Grupo control (G1):



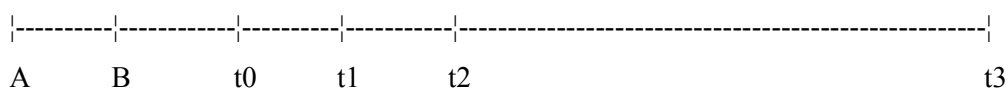
A = Anestesia

A-B = Estabilización hemodinámica (30 minutos).

tB= Toma basal, inmediatamente antes de realizar la lesión del vaso.

t1, t2, t3 = Tiempo transcurrido tras la lesión vascular, 20, 40, y 120 minutos respectivamente.

#### B. Grupo 2a:



A = Anestesia

A-B = Estabilización hemodinámica (30 minutos).

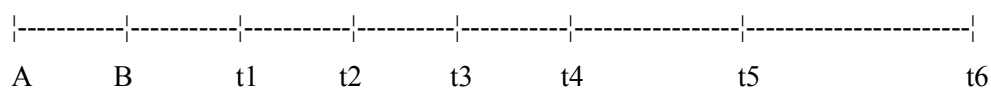
tB= Toma basal, antes de inyectar ACTH.

B-t0 = Tiempo de actuación del fármaco = 1 hora.

t0 = Primera toma antes de realizar la lesión del vaso.

t1, t2, t3 = Tiempo transcurrido tras la lesión vascular, 20, 40, y 120 minutos respectivamente.

### C. Grupo 2b:



A = Anestesia.

A-B = Estabilización hemodinámica (30 minutos).

tB= Toma basal, antes de inyectar ACTH.

t1, t2, t3, t4, t5, t6 = Tiempo transcurrido tras la inyección de ACTH, 20, 40, 60, 90, 120 y 180 minutos respectivamente.

*Figura 3. Cronograma de extracción de muestras de sangre en cada grupo de animales.*

### Valoración del grado de lesión de la pared vascular y oclusión de la luz del vaso por trombo

Se efectuaron mediciones histomorfométricas de cada segmento afectado y la zona sana adyacente, como se describe en nuestro trabajo previo [27]. Se midió el área total de la pared del vaso (ATPV) del segmento afectado, el área de la pared del vaso destruida (APVD), el área de luz residual del vaso en la zona lesionada (ALRV) y el área de luz del vaso de la zona sana adyacente (ALVS). El porcentaje de destrucción de la pared del vaso (% DPV) y el porcentaje de obstrucción del vaso (% OV) del segmento afectado, se calcularon con las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ DPV} = [\text{ATPV} - \text{APVD}] \times 100 / \text{ATPV}$$

$$\% \text{ OV} = [\text{ALVS} - \text{ALRV}] \times 100 / \text{ALVS}$$

### Extracción y procesamiento de las muestras de sangre

La obtención de las muestras de sangre se realizó a través del catéter introducido en la vena yugular derecha, en los tiempos indicados anteriormente. Se recogió un total de 30 ml de sangre repartidos en tubos Venoject (Terumo Europe NV. Leuven, Bélgica) estériles con citrato trisódico 0,129 M (relación 1:9 vol.) como anticoagulante (20 ml, repartidos en tres tubos), o gel separador (10 ml).

Los tubos de sangre se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su centrifugación. El recuento plaquetario se realizó con un contador de células (Medonic

CA 530+. Lebbyac. Lomas de Zamora, España), estando en cada muestra dentro de los rangos normales en cerdos. Los tubos con citrato fueron centrifugados en una centrífuga refrigerada (Digtor-R; rotor de 19 cm de radio. Orto-Alresa. Madrid, España) a 800 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se recogió el sobrenadante para obtener plasma rico en plaquetas (Prp). La sangre residual se volvió a centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtener plasma pobre en plaquetas (Ppp).

El tubo de gel separador fue centrifugado a 20°C y 2.000 rpm durante 10 minutos para la obtención de suero.

Las muestras de suero fueron recogidas y conservadas a – 80°C hasta su análisis posterior.

#### Análisis de la agregación plaquetaria

Todas las muestras fueron analizadas en un tiempo no superior a las tres horas de la extracción.

La agregación plaquetaria se realizó en Prp por el método turbidimétrico desarrollado por Born [7] utilizando un agregómetro de transmisión de luz (Chrono-log, Model 490, Chrono-log Corp., Havertown, PA, USA).

El análisis de la agregación se realizó ajustando el agregómetro con Prp como referencia de 0% de transmisión de luz (0% de agregación), y Ppp como referencia del 100%, y se midió durante 5 minutos el aumento en la transmisión de luz a través de la suspensión de Prp sometida a agitación constante e incubada a 37°C en ausencia (agregación espontánea) o presencia de un agonista.

El análisis de la agregación en la sangre de los cerdos se realizó empleando como agonista adenosina 5´difosfato (ADP) (Chrono-log Corp., Havertown, PA, USA) a concentraciones de 15 y 30  $\mu$ M. En cada muestra de sangre se determinó la agregación espontánea y la agregación plaquetaria inducida con cada una de las concentraciones del agonista por duplicado. Los valores obtenidos se expresaron como porcentajes.

### Determinaciones bioquímicas

Los niveles de cortisol se determinaron en suero empleando un kit comercial (DPC, Diagnostic Products Corporation. Los Angeles, USA) basado en la técnica del inmunoensayo competitivo por quimioluminiscencia, mediante un autoanalizador IMMULITE (DPC, Diagnostic Products Corporation. Los Angeles, USA). Los valores obtenidos se expresaron en µg/dl, unidades estándar.

Los niveles de IL-6 fueron valorados en suero empleando un kit comercial específico para cerdos (DRG porcine IL-6, ELISA. DRG Diagnostics. Marburg/lahn, Alemania), basado en la técnica de enzimoimmunoensayo. Los valores obtenidos se expresaron en pg/ml, unidades estándar.

Cada variable bioquímica se determinó por duplicado en cada uno de los casos.

### Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el paquete estadístico SPSS 12.0. Los datos se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (DE). En cada grupo de animales las variables bioquímicas y la agregación plaquetaria se compararon mediante un ANOVA de un factor con medidas repetidas. La comparación de estas variables entre los distintos grupos se llevó a cabo mediante un ANOVA de dos factores con medidas repetidas en uno de ellos. Los tiempos medios de oclusión total de las arterias en los grupos con lesión vascular se estimaron mediante el método de Kaplan-Meier; la comparación de este parámetro entre los dos grupos se hizo con el test de Wilcoxon. En todos los casos se estableció un nivel de significación del 5%: ( $p = 0,05$ ), de modo que se exige un valor de  $p < 0,05$  para considerar las diferencias estadísticamente significativas.

## IV.2. EXPERIMENTOS *EX VIVO*

### Sujetos de estudio

Se estudió un total de 100 voluntarios sanos (44 hombres/56 mujeres) con edades comprendidas entre los 20 y los 35 años. Fueron excluidos aquellos donantes que tomaron antiinflamatorios no esteroideos, ácido acetilsalicílico, antibióticos, tranquilizantes o antidepresivos tricíclicos [132] durante la semana previa a la extracción de sangre. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, y todos los individuos fueron informados y dieron su consentimiento antes de proceder a la recogida de muestras sanguíneas.

### Extracción y procesamiento de las muestras de sangre

Las extracciones sanguíneas se realizaron siempre antes de las 12 de la mañana (para evitar posibles variaciones debidas a los ritmos circadianos), estando los donantes en reposo. La sangre se extrajo de la vena cubital con jeringas de plástico, y se repartió en tubos Venoject (Terumo Europe NV. Leuven, Bélgica) estériles con citrato trisódico 0,129 M (relación 1:9 vol.) como anticoagulante. El recuento plaquetario se realizó con un contador de células (Medonic CA 530+. Lebbyac. Lomas de Zamora, España), estando en cada muestra dentro de un rango de  $150-300 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{l}$ . Todas las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente antes de ser analizadas en un tiempo no superior a las tres horas de la extracción.

La sangre empleada para los ensayos de agregación plaquetaria, se centrifugó para obtener Prp y Ppp como se describe en el apartado de los experimentos *in vivo*.

Para los análisis realizados mediante citometría de flujo, la sangre anticoagulada se diluyó en tampón Tyrode's (137 mM de NaCl, 0,5 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM de Hepes, 12 mM de  $\text{HNaCO}_3$ , 2 mM de KCl y 2 mM de Ca a PH 7,4; relación 1:9 vol.) enriquecido con 5mM de glucosa y 0,2% de BSA (ambos de Sigma-Aldrich CO., St. Louis, USA).

## Protocolo de estudio

### *Análisis del efecto de la ACTH sobre la agregación espontánea y la inducida por agonistas fisiológicos (n = 80)*

Se analizó la influencia de distintas concentraciones de ACTH, 0,125 µg/ml (esta concentración de ACTH es equivalente a los 0,5 mg de ACTH inyectados en cerdos en los experimentos *in vivo*), 200, 100, 75, 50 y 25 pg/ml (Nuvacthén<sup>R</sup> Depot, 1 mg/ml), en la agregación espontánea, es decir, cuando no se incubó el Prp con ningún agonista, y en la agregación plaquetaria inducida por distintas concentraciones de ADP (0,8 µM, 1,3 µM, 1,7 µM, y 6,7 µM), epinefrina (0,2 µM, 0,7 µM, y 11 µM), o colágeno (0,1µM, 0,25 µM, y 0,4 µM) (todos ellos de Chrono-log Corp., Havertown, PA) como agonistas.

El análisis de la agregación se realizó por duplicado como se describe en el apartado de los experimentos *in vivo*. Los valores obtenidos se expresaron como porcentajes.

La elección de las concentraciones de ACTH empleadas, se basó en las diferencias encontradas previamente en nuestro laboratorio en los niveles circulantes de esta hormona, en un grupo de 20 sujetos sanos y otro grupo de 25 pacientes con evidencias de enfermedad coronaria.

### *Evaluación del efecto del bloqueo de los receptores de ADP en la agregación plaquetaria inducida por ADP y/o ACTH (n = 10)*

En otro grupo de voluntarios, se analizó el efecto del bloqueo de los receptores de ADP sobre la agregación plaquetaria, en un Prp incubado con 0 ó 100 pg/ml de ACTH, e inducido con 1,7 µM de ADP. Para bloquear los receptores de ADP antes de añadir el agonista y la ACTH, se incubaron las muestras durante 10 minutos con 10 ó 100 µM de adenosina 3'-fosfato 5'-fosfosulfato (A3P5PS) [9,60] y/o 2-metiltioadenosina-5'-monofosfato (2MeSAMP) [50,58] (ambos de Sigma-Aldrich. St. Louis, Missouri, USA), que actúan bloqueando los receptores plaquetarios P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub> respectivamente.

El análisis de la agregación plaquetaria se realizó por duplicado como se describe en el apartado de los experimentos *in vivo*. Los valores obtenidos se expresaron como porcentajes.

*Análisis del efecto del cortisol sobre la agregación espontánea y la inducida por ADP (n = 10)*

Se evaluó el efecto de concentraciones fisiológicas (13 µg/dl), ligeramente supra fisiológicas (35 µg/dl) y supra fisiológicas (52,4 µg/dl) de cortisol (hydrocortisone H-4001, Sigma-Aldrich. St. Louis, Missouri, USA), en la agregación espontánea y en la agregación plaquetaria inducida por 0,6, 1,7 ó 6,7 µM de ADP como agonista.

El análisis de la agregación plaquetaria se realizó por duplicado como se describe en el apartado de los experimentos *in vivo*. Los valores obtenidos se expresaron como porcentajes.

La elección de estas concentraciones se basó en las diferencias encontradas previamente en nuestro laboratorio en los niveles de cortisol de un grupo de 40 sujetos sanos y un grupo de 129 pacientes con evidencias de enfermedad coronaria [28].

*Determinación de los niveles de AMPc en plaquetas incubadas con ACTH (n = 4)*

Se analizó el efecto de la incubación de las plaquetas con ACTH 100 pg/ml y/o ADP 1,7 µM como agonista sobre los niveles de AMPc intracelulares. Se empleó una muestra de plaquetas incubadas con 1 µM de prostaglandina (PG) E-1 (Calbiochem, Merk Chemicals. Darmstadt, Alemania) como control positivo, y otra muestra de plaquetas incubadas con suero fisiológico como control negativo.

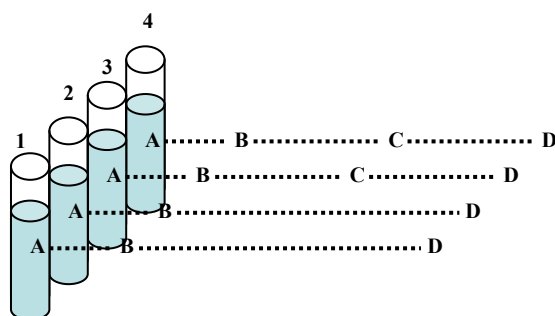
Las muestras de Prp se diluyeron con una solución de lavado (140 mM de ClNa, 0,5 mM de KCl, 12 mM de citrato trisódico, 10 mM de glucosa y 12,5 mM de sacarosa a pH 6), y se centrifugaron durante 10 minutos a 2.200 rpm a temperatura ambiente; tras varios lavados los precipitados obtenidos se resuspendieron en tampón Tyrode's enriquecido, ajustando a  $3 \times 10^8$  el número de plaquetas por muestra. A continuación, se añadió a las muestras ADP, ACTH, PGE-1 y/o suero fisiológico durante 5 minutos a 37°C, y se detuvo la incubación centrifugando las muestras a 1.600 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los precipitados fueron resuspendidos en HCl 0,1 M y sometidos a ciclos de congelación/descongelación para lisar las plaquetas. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 1.600 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtener el sobrenadante, que se guardó a - 20°C hasta su análisis por ELISA siguiendo las instrucciones del kit. Las concentraciones intracelulares de AMPc se midieron utilizando un kit comercial de ELISA (Cayman Chemical Company. Michigan, USA). Las muestras se analizaron por cuatriplicado y los valores obtenidos se expresaron en pmol/ml, unidades estándar.



*Determinación de la movilización de calcio intraplaquetario en respuesta a la incubación con ACTH (n = 20)*

Se analizó la movilización de calcio en plaquetas sin estimular y estimuladas con ADP 1,7  $\mu$ M y/o 100 ó 200 pg/ml de ACTH mediante citometría de flujo.

La sangre total diluida se repartió en tubos para citometría y se incubó en semioscuridad durante 15 minutos a 37°C con 2  $\mu$ M de Fluo-4 (Molecular Probes, Invitrogen Ltd. Paisley, Reino Unido), excepto un tubo que se dejó sin marcar como control para determinar la población de plaquetas. A continuación, se añadió a cada tubo 5  $\mu$ l de anticuerpo anti-CD61 conjugado con ficoeritrina (CD61\*PE, Becton Dickinson Biosciences. Franklin Lakes, USA), para marcar las plaquetas, y se incubó durante 15 minutos a 37°C en oscuridad. Finalmente, se añadió a cada tubo 500  $\mu$ l de tampón Tyrode's y se analizaron las muestras por citometría de flujo (*Fig. 4*), en un citómetro EPICS XL (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA, USA), equipado con software R 2.0, XL System (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA, USA). Los resultados obtenidos se expresaron como porcentajes de fluorescencia [67].



*Figura 4.* Análisis de calcio intraplaquetario. Para determinar los niveles de calcio basales, se introdujo cada tubo sin estimular en el citómetro y se adquirieron eventos durante 15 segundos (A-B), de manera que cada muestra sin estimular es su propio control negativo. A continuación, se detuvo la adquisición de eventos y se añadió ADP en los tubos 1 y 3, y ACTH (100 ó 200 pg/ml) en los tubos 2 y 4. Se reanudó la adquisición de eventos hasta los 150 segundos (B-D) en los tubos 1 y 2, y hasta los 90 segundos (B-C) en los tubos 3 y 4, en los cuales se detuvo de nuevo la adquisición de eventos, para añadir ACTH (100 ó 200 pg/ml) en el tubo 3 y ADP en el tubo 4, y se continuó la adquisición de eventos hasta los 210 segundos (C-D).

### *Evaluación de la activación plaquetaria (n = 10)*

Se evaluó el efecto de la incubación con ACTH o cortisol sobre la activación de los receptores de fibrinógeno (GP IIbIIIa), en ausencia o presencia de un agonista, mediante citometría de flujo.

Las muestras de sangre total diluida se preincubaron con ACTH (concentración final de 0 ó 100 pg/ml) o cortisol (concentración final de 0, 13, 35, ó 52,4 µg/dl) y ADP como agonista (concentración final de 0, 0,5 ó 2 µM), durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, con 5 µl de anticuerpo PAC-1 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (PAC-1 FITC, Becton Dickinson Biosciences. Franklin Lakes, USA), para analizar el porcentaje de activación del complejo GP IIbIIIa, y con CD61\*PE para marcar las plaquetas. Antes de analizar las muestras se añadió tampón de lisis (OptiLyse<sup>R</sup> No-Wash Lysing solution. Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA, USA) para fijar las plaquetas y eliminar los eritrocitos. Para evitar las posibles interferencias de partículas en los reactivos, todas las soluciones fueron filtradas a través de filtros estériles de 0,22 µm (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA).

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo EPICS XL, equipado con los filtros estándar para el análisis de fluorescencia del isotiocianato de fluoresceína y la ficoeritrina, y con un software R 2.0, XL System. Se recogieron los datos de fluorescencia y *light scatter* de un número de eventos igual a 20.000 plaquetas, con un ratio de flujo menor de 500 partículas/s y con todos los detectores en modo logarítmico. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentajes de fluorescencia.

### Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el paquete estadístico SPSS 12.0. En todos los casos, se consideró un nivel de significación del 5%: ( $p = 0,05$ ), de modo que se exige un valor de  $p < 0,05$  para considerar las diferencias estadísticamente significativas.

La valoración de los análisis empleados para medir el efecto de la ACTH sobre la agregación plaquetaria inducida por agonistas fisiológicos se realizó mediante un modelo de regresión lineal múltiple, en el cual se introdujeron como variables regresoras: la agregación basal inducida por un agonista cualquiera, la concentración de

ACTH empleada (0,125 µg/ml, 200, 100, 75, 50 ó 25 pg/ml) y el agonista utilizado en cada análisis (ADP, epinefrina o colágeno).

Para conocer el efecto de las distintas concentraciones de ACTH y de los agonistas en el incremento que sufre la agregación plaquetaria debido a su utilización, se determinó el incremento relativo de la agregación plaquetaria (IRAP) inducida por cualquier concentración de ACTH y cualquier agonista mediante la siguiente fórmula: 
$$\left[ \frac{(\% \text{ agregación final inducida mediante cualquier concentración de ACTH y un agonista} - \% \text{ agregación basal inducida únicamente con dicho agonista})}{\% \text{ agregación basal inducida únicamente con dicho agonista}} \right] \times 100$$
. A continuación, se calculó la mediana del IRAP, y se analizó la probabilidad de que el IRAP de una muestra sea superior a la mediana mediante regresión logística, introduciendo como variables regresoras la agregación basal inducida por un agonista cualquiera, la concentración de ACTH empleada y el agonista utilizado en dicha muestra. Se emplearon los *odds ratio* (OR) para describir el riesgo relativo que supone la utilización de un valor determinado de la variable regresora en comparación con otro, adoptándose la concentración de 100 pg/ml, y el ADP como referencia para las variables regresoras cualitativas (concentración de ACTH y agonista utilizado), y el aumento en un 1% de la agregación plaquetaria para la variable regresora cuantitativa (agregación basal inducida por un agonista cualquiera).

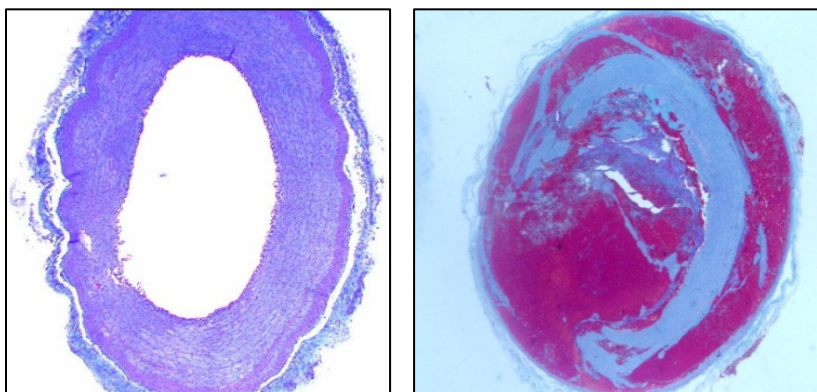
Las medias de los análisis realizados para determinar el efecto del bloqueo de los receptores de ADP, el efecto del cortisol sobre la agregación espontánea y sobre la agregación plaquetaria inducida por ADP, el efecto de la ACTH en los niveles de AMPc intracelular y la movilización de calcio y la activación plaquetaria analizadas por citometría, se compararon mediante el test de la *t* de student unimuestral para muestras relacionadas. Los datos se expresaron como media  $\pm$  DE.

## V. RESULTADOS

### V.1. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

#### Grupo control (G1)

En una primera serie de experimentos, llevamos a cabo la lesión de la arteria carótida común de 18 animales (cerdos). La formación de trombo oclusivo se observó a los  $34,5 \pm 7,16$  minutos después de la lesión. El estudio histomorfométrico puso de manifiesto que el porcentaje de obstrucción del vaso por la formación de trombo fue del  $95 \pm 2\%$ , y el área de destrucción del vaso del  $73,6 \pm 8,3\%$  (*Fig. 1*).



*Figura 1.* Comparación de una arteria sana (izquierda) y una lesionada (derecha), ambas teñidas con tricrómico de Masson. En la arteria lesionada se puede observar que la luz del vaso está completamente ocluida por el trombo, además se aprecia desestructuración de la pared del vaso y hemorragia intramural.

El porcentaje de agregación plaquetaria basal ( $45,5 \pm 11,72\%$ ) experimentó un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ) a los 20 y 40 minutos de haber causado la lesión de la pared del vaso ( $56,17 \pm 10,78\%$  y  $58,22 \pm 10,62\%$ , a los 20 y 40 minutos respectivamente). A los 120 minutos, la agregación plaquetaria ( $50,31 \pm 14,09\%$ ) no presentó diferencias significativas respecto a su valor basal.

Los niveles circulantes basales de cortisol ( $3,95 \pm 2,16 \mu\text{g/dl}$ ) se incrementaron de forma estadísticamente significativa a los 20, 40 y 120 minutos ( $p = 0,015$ ,  $p = 0,001$

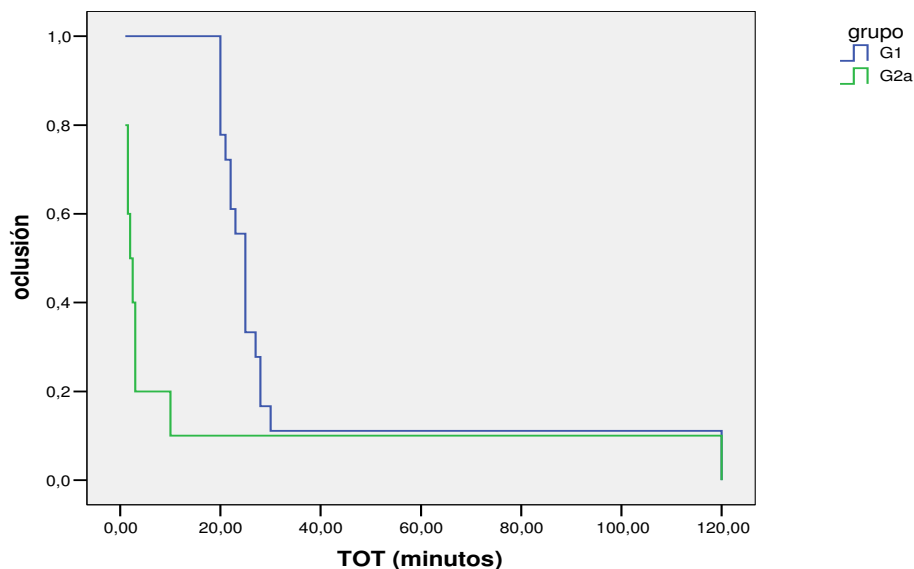
y  $p < 0,001$  en t1, t2 y t3 respectivamente) de haber realizado la lesión de la arteria respecto a los niveles basales (*Tabla 1*).

El valor basal de la IL-6 (indetectable) experimentó un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ) a los 20, 40 y 120 minutos de realizar la lesión del vaso respecto de su valor basal ( $64,5 \pm 12,2$ ,  $249,5 \pm 21,2$  y  $920,1 \pm 36,3$  en t1, t2 y t3 respectivamente).

### Grupo de estudio

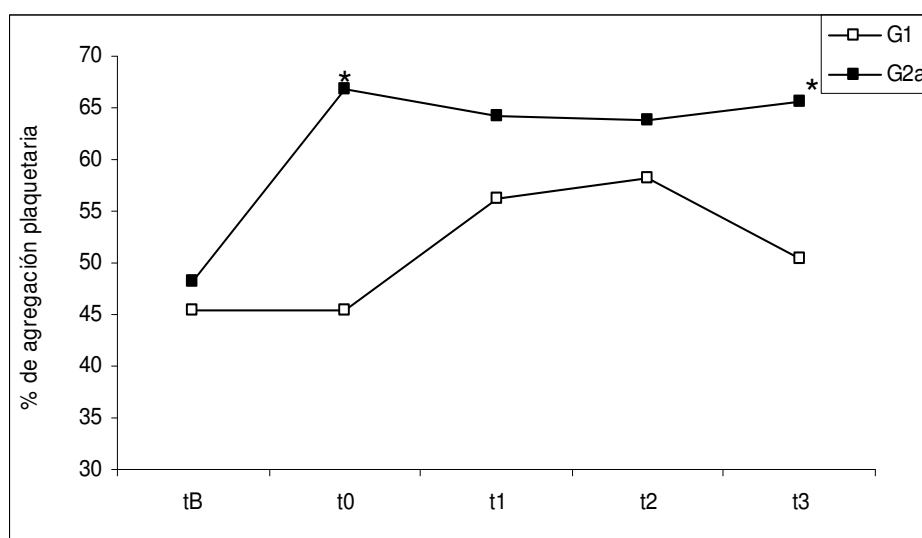
#### *Subgrupo G2a*

En el subgrupo de animales empleados para conocer los efectos en la formación de trombo de la elevación de los niveles circulantes de ACTH, previa a la lesión de la pared del vaso (G2a), observamos que el tiempo de oclusión de la luz del vaso por la formación de trombo fue de  $2,83 \pm 0,93$  minutos. La velocidad de oclusión de la arteria fue 22,56 veces mayor que en el grupo control ( $p < 0,001$ ) (*Fig. 2*). Los estudios histomorfométricos mostraron un  $96 \pm 2\%$  de obstrucción de la luz del vaso y un  $77,6 \pm 9,5\%$  de destrucción de la pared.



*Figura 2.* Comparación de los tiempos de oclusión total (TOT) de la arteria carótida derecha común en los grupos con lesión (G1 y G2a) mediante curvas de supervivencia de Kaplan-Meier.

El porcentaje de agregación basal ( $tB = 45,56 \pm 12,69\%$ ) en este subgrupo de animales es similar al del grupo control. Después de una hora de haber inyectado la ACTH y sin haber causado la lesión de la pared del vaso ( $t0$ ), el porcentaje de agregación plaquetaria ( $64 \pm 11,13\%$ ) se incrementó de forma estadísticamente significativa ( $p = 0,004$ ) respecto al porcentaje de agregación basal. Este aumento se mantuvo invariable durante todo el experimento ( $t1$ ,  $t2$ , y  $t3$ ). Hay que resaltar que el porcentaje de agregación tras la lesión del vaso ( $t1 = 64,17 \pm 10,64\%$ ) no presentó diferencias significativas con respecto a los valores obtenidos en  $t0$ . Al finalizar el experimento, 120 minutos después de realizar la lesión de la arteria, la agregación plaquetaria en este grupo se mantuvo elevada y fue significativamente diferente ( $p = 0,033$ ) al porcentaje de agregación obtenido en el mismo período de tiempo en el grupo control (*Fig. 3*).



*Figura 3.* Comparación de la agregación plaquetaria entre el subgrupo de cerdos G2a y el grupo control (G1). \* = significación estadística *versus* G1, se exige un valor de  $p < 0,05$  para considerar las diferencias estadísticamente significativas. Las muestras se obtuvieron en los siguientes intervalos:  $tB$  = basal, antes de inyectar ACTH,  $t0$  = tras una hora de inyectar la ACTH, y antes de realizar la lesión de la pared del vaso, en el grupo control es la misma que  $tB$ ; y en  $t1$ ,  $t2$  y  $t3$  = a los 20, 40 y 120 minutos de realizar la lesión.

Los niveles basales de cortisol en este subgrupo ( $4,59 \pm 3,51 \mu\text{g/dl}$ ) no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los encontrados en el grupo control. Después de una hora de haber inyectado la ACTH y sin haber causado la lesión de la pared del vaso, los niveles de cortisol ( $t_0 = 11,22 \pm 4,36 \mu\text{g/dl}$ ) presentaron un aumento estadísticamente significativo ( $p = 0,020$ ) respecto a los valores basales. Este incremento se mantuvo invariable a lo largo de todo el experimento ( $13,44 \pm 5,32 \mu\text{g/dl}$ ,  $15,55 \pm 6,53 \mu\text{g/dl}$  y  $13 \pm 4,1 \mu\text{g/dl}$ , a los 20, 40 y 120 minutos respectivamente) (Tabla 1).

Los niveles de IL-6 en este grupo, se mantuvieron indetectables durante todo el experimento (tabla 1).

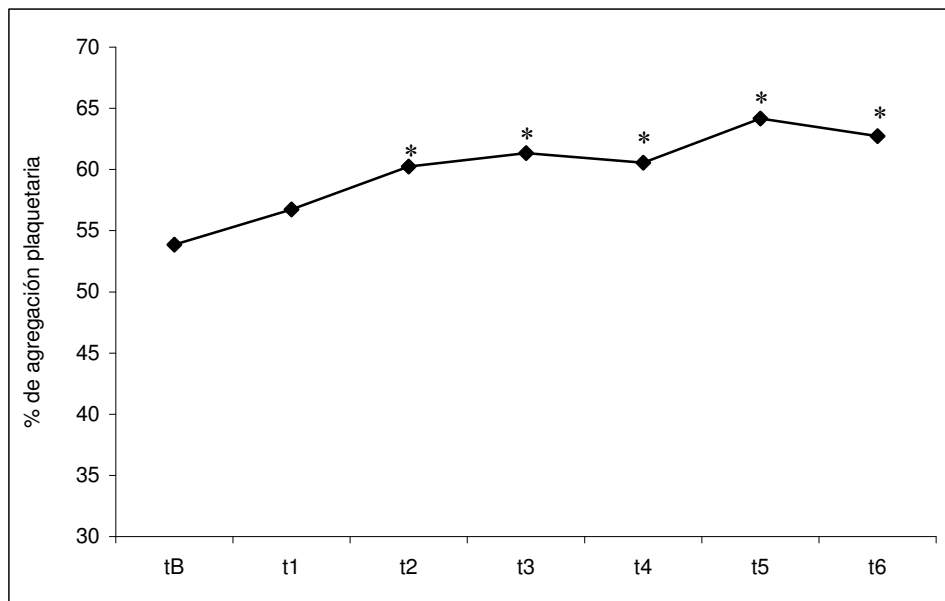
		tB	t0	t1	t2	t3
CORTISOL ( $\mu\text{g/dl}$ )	G1	$4 \pm 2,2$	$4 \pm 2,2$	$6,3 \pm 3,8$	$8,6 \pm 5$	$11,9 \pm 6$
	G2a	$4,1 \pm 3,3$	$11,6 \pm 4^*$	$13,9 \pm 5,2^*$	$15,4 \pm 6,1^*$	$13 \pm 4,1$
IL-6 (mg/dl)	G1	indetectable	indetectable	$64,5 \pm 12,2$	$249,5 \pm 21,2$	$920,1 \pm 36,3$
	G2a	indetectable	indetectable	indetectable*	indetectable*	indetectable*

Tabla 1. Niveles circulantes de IL-6 y cortisol en el grupo control (G1) y en el subgrupo de estudio con niveles elevados de ACTH y posterior lesión vascular (G2a). \* = significación estadística *versus* G1, se exige un valor de  $p < 0,05$  para considerar las diferencias estadísticamente significativas. Las muestras se obtuvieron en los siguientes intervalos: tB = basal, antes de inyectar ACTH, t0 = muestra recogida tras inyectar la ACTH, y antes de realizar la lesión del vaso; y en t1, t2 y t3 = a los 20, 40 y 120 minutos de realizar la lesión.

#### Subgrupo G2b

En el subgrupo de animales empleados para conocer los efectos sobre la agregación plaquetaria de la elevación de los niveles circulantes de ACTH en ausencia de lesión de la pared vascular (G2b), observamos que el porcentaje de agregación plaquetaria experimentó un aumento estadísticamente significativo ( $p = 0,003$ ) tras 40 minutos de haber inyectado la hormona ( $t_2 = 60,25 \pm 8,76\%$ ), con respecto al porcentaje de agregación basal ( $tB = 53,86 \pm 8,6\%$ , porcentaje similar al obtenido en el grupo

control). Dicho aumento se mantuvo invariable durante todo el experimento ( $61,35 \pm 11,76\%$ ,  $60,56 \pm 12,46\%$ ,  $64,18 \pm 11,05\%$ , y  $62,73 \pm 8,14\%$ , a los 60, 90, 120, y 180 minutos de inyectar la ACTH respectivamente) (*Fig. 4*). El análisis ANOVA de dos factores con medidas repetidas en unos de ellos no mostró diferencias significativas en la agregación plaquetaria entre ambos grupos de estudio.



*Figura 4.* Efectos del aumento de los niveles circulantes de ACTH sobre la agregación plaquetaria en animales sin lesión de la pared vascular (G2b). \* = significación estadística respecto a la muestra basal, se exige un valor de  $p < 0,05$  para considerar las diferencias estadísticamente significativas. Las muestras se obtuvieron en los siguientes intervalos: tB = basal, antes de inyectar ACTH y t1, t2, t3, t4, t5 y t6 = a los 20, 40, 60, 90, 120 y 180 minutos de administrar la hormona.

Los niveles de cortisol endógeno se incrementaron significativamente ( $p = 0,012$ ) a los 20 minutos de inyectar la hormona ( $t1 = 8,44 \pm 2,42 \mu\text{g/dl}$ ), con respecto a los valores basales ( $tB = 4,76 \pm 3,06 \mu\text{g/dl}$ ), los cuales no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los del grupo control. Los niveles de cortisol se mantuvieron elevados a lo largo del experimento (*Tabla 2*).

Los niveles circulantes de IL-6 no sufrieron cambios respecto de los valores basales, manteniéndose indetectables a lo largo de todo el experimento (*Tabla 2*).



	tB	t1	t2	t3	t4	t5	t6
IL-6 (pg/ml)	indetectable	indetectable	indetectable	indetectable	indetectable	indetectable	indetectable
CORTISOL (µg/dl)	4,8 ± 3,1	8,4 ± 2,4*	9,1 ± 2,3*	10,2 ± 2,4*	11 ± 2,7*	11,8 ± 3,3*	12,4 ± 3,2*

*Tabla 2.* Niveles circulantes de IL-6 y cortisol en el grupo de estudio sin lesión vascular (G2b).

\* = significación estadística respecto a la muestra basal, se exige un valor de  $p < 0,05$  para considerar las diferencias estadísticamente significativas. Las muestras se obtuvieron en los siguientes intervalos: tB = basal, antes de inyectar ACTH y t1, t2, t3, t4, t5 y t6 = a los 20, 40, 60, 90, 120 y 180 minutos de administrar la hormona.

## V.2. EXPERIMENTOS *EX VIVO*

### Análisis del efecto de la ACTH sobre la agregación espontánea y la inducida por agonistas fisiológicos

El análisis de la agregación plaquetaria realizado en sangre de voluntarios sanos, mostró que la adición de cualquiera de las concentraciones de ACTH empleadas en las muestras de Prp en ausencia de un agonista (agregación espontánea), no tiene efectos estadísticamente significativos sobre el porcentaje agregación (*Tabla 3*).

ACTH	0.125	200	100	75	50	25	0
AP	1.15	1.05	0.85	1.05	0.9	1.1	1.1
DE	1.23	1.14	1.2	1.12	1.02	1.15	1.45

*Tabla 3.* Análisis del efecto de la ACTH (concentraciones: 0.125 µg/ml, 200, 100, 75, 50, 25 y 0 pg/ml) sobre la agregación espontánea. Tanto la agregación plaquetaria (AP) como la desviación estándar (DE) se expresan en porcentajes.

Al valorar la acción de la ACTH sobre la agregación plaquetaria inducida por agonistas fisiológicos mediante regresión múltiple, se observó que el porcentaje de agregación final, depende del porcentaje inicial de agregación inducido por un agonista cualquiera, de la concentración de ACTH empleada y del agonista usado en cada análisis.

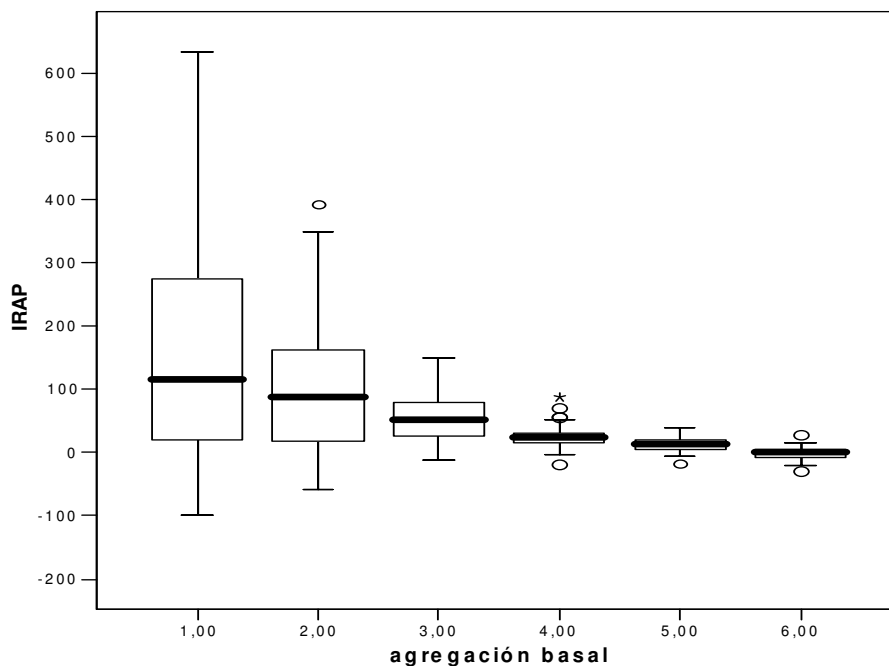
Con todas las concentraciones de ACTH y agonista empleadas, se obtuvo que el IRAP, en el 50% de los casos, fue superior al 31,25%.

Para conocer el efecto de las distintas concentraciones de ACTH y de los diferentes agonistas, y de las concentraciones de los mismos, se analizó la probabilidad de que el IRAP de una muestra fuera superior a la mediana (31,25%) mediante regresión logística. De este modo, se encontró que la utilización del ADP como agonista de la agregación plaquetaria, aumenta el riesgo de que el IRAP sea superior a la mediana, respecto de aquellas muestras en las que se empleó como agonistas la epinefrina o el colágeno (epinefrina: OR = 2,31 y  $p = 0,009$ ; colágeno: OR = 3,18 y  $p = 0,004$ ).

También se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de 200, 100 y 25 pg/ml de ACTH con las que se incubaron las muestras. La utilización de 200 pg/ml de la hormona, frente a 100 pg/ml aumenta 2,71 veces la probabilidad de que el IRAP sea mayor al 31,25% (OR = 2,711,  $p = 0,007$ ). Mientras que, la concentración de 25 pg/ml de ACTH disminuye el riesgo de que el IRAP alcance el valor de la mediana ( $OR_{ACTH100/ACTH25} = 3,7$ ,  $p = 0,003$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas empleando 0,125 µg/ml, 75 y 50 pg/ml de ACTH, respecto a la concentración de 100 pg/ml de la hormona.

Así mismo, se encontró que cuanto mayor es el porcentaje basal de agregación inducido por un agonista cualquiera, menor es la probabilidad de que el IRAP sea superior al 31,25% (el aumento de un 1% en el porcentaje de agregación basal disminuye 0,943 veces esta probabilidad,  $p < 0,001$ ). Dividiendo el porcentaje basal de agregación inducido por un agonista cualquiera en seis intervalos: 1 = [0-15], 2 = (15-30], 3 = (30-45], 4 = (45-60], 5 = (60-75] y 6 = (75-100], se observó una disminución progresiva de las medianas del IRAP correspondientes a cada intervalo, siendo las medianas 115%, 96,93%, 52,77%, 22,24%, 13,41% y 0,64%, para los intervalos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente (*Fig. 5*). Cuando el porcentaje de agregación plaquetaria se

encontró entre 5% y 60%, la adición de cualquiera de las concentraciones empleadas de ACTH incrementó significativamente ( $p < 0,001$ ) el porcentaje de agregación que previamente había inducido el ADP. Cuando la agregación plaquetaria inducida por un agonista fue superior al 60%, la ACTH, a las concentraciones y tiempos empleados en el presente estudio, no modificó significativamente la agregación plaquetaria.



*Figura 5.* Efecto de la ACTH sobre la agregación plaquetaria inducida por agonistas fisiológicos *ex vivo*. En el eje de categorías se representa la agregación basal inducida por cualquier agonista, agrupada en intervalos: 1 = [0-15], 2 = (15-30], 3 = (30-45], 4 = (45-60], 5 = (60-75] y 6 = (75-100]. La variable es el incremento relativo de la agregación plaquetaria (IRAP) producido por cualquiera de las concentraciones de ACTH testadas. Se muestra la mediana, los rangos intercuartílicos, los valores atípicos (círculos) y los casos extremos (asterisco).

Empleando como agonistas de la agregación la epinefrina y el colágeno, se observó un comportamiento de la ACTH similar al encontrado con el ADP. En el caso del colágeno, aunque se apreció un incremento de la agregación control debido a la ACTH, sólo se produjo un aumento estadísticamente significativo cuando la agregación control pertenecía al intervalo de entre 45% y 60% (*Tabla 4*).

		0-15%	15-30%	30-45%	45-60%	60-75%	75-100%
ADP	cont	10,7 ± 4,6	22,2 ± 4,1	39,2 ± 4,3	49,1 ± 3,5	67,7 ± 5,2	86,1 ± 11,7
	ACTH	26,2 ± 18*	49,8 ± 18,1*	64,7 ± 13*	71,8 ± 11,6*	77,7 ± 11,3*	86,5 ± 6,2
EPI	cont	11,2 ± 2,5	20,8 ± 5,1	37,1 ± 4,4	47,5 ± 0,0	66 ± 3,2	82 ± 4
	ACTH	18,5 ± 8,2*	35,9 ± 17,3*	51,1 ± 11*	49 ± 8,6	75,5 ± 5,5*	81,7 ± 11,9
COL	cont	7,2 ± 6	23,1 ± 6,6	43,5 ± 1,4	53 ± 2,9	68,9 ± 4,5	78,9 ± 2,1
	ACTH	13,5 ± 11,6	47,1 ± 6,6	58,5 ± 5,7	64,3 ± 4,6*	75,6 ± 7,4	78,5 ± 5,3

*Tabla 4.* Porcentajes de agregación plaquetaria obtenidos al incubar Prp con cualquier concentración de ADP, epinefrina (EPI) o colágeno (COL), en ausencia (cont) o presencia de 100 pg/ml de ACTH. \* = significación estadística de cada muestra respecto a su control, se exige un valor de  $p < 0,05$  para considerar las diferencias estadísticamente significativas.

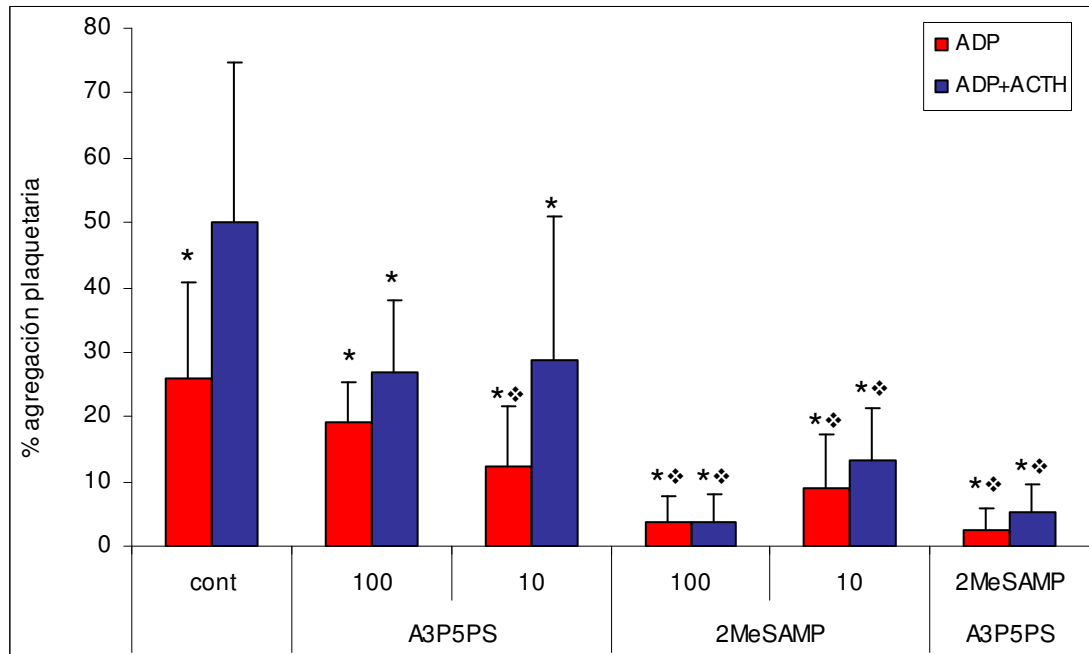
#### Evaluación del efecto del bloqueo de los receptores de ADP en la agregación plaquetaria inducida por ADP y/o ACTH

Cuando las muestras fueron incubadas con 10  $\mu$ M del antagonista A3P5PS se produjo la inhibición del receptor  $P2Y_1$  (*Fig.6*), obteniéndose diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) en la agregación plaquetaria ( $12,47 \pm 9,27\%$ ) respecto al porcentaje encontrado al incubar las plaquetas con ADP (control:  $25,8 \pm 14,89\%$ ), o con ADP y ACTH ( $50,1 \pm 24,48\%$ ).

La inhibición del receptor  $P2Y_{12}$  con ambas concentraciones de 2MeSAMP (*Fig.6*), produjo una disminución significativa ( $3,67 \pm 3,9\%$ ,  $p = 0,001$  y  $9,12 \pm 8,1\%$ ,  $p < 0,001$  con 100 y 10  $\mu$ M de 2MeSAMP respectivamente) del porcentaje de agregación plaquetaria respecto al control ( $25,8 \pm 14,89\%$ ). La adición de ACTH a las muestras inhibidas con este antagonista no modificó significativamente la agregación plaquetaria ( $3,67 \pm 4,24\%$ ,  $p < 0,001$  y  $13,35 \pm 7,75\%$ ,  $p = 0,001$  con 100 y 10  $\mu$ M de 2MeSAMP respectivamente).

La utilización conjunta de los inhibidores de ambos receptores produjo una disminución significativa ( $p = 0,002$ ) de la agregación plaquetaria ( $2,63 \pm 3,34\%$ )

respecto a la inducida por el ADP (control:  $25,8 \pm 14,89\%$ ). La incubación posterior de las plaquetas con ACTH ( $5,19 \pm 4,38\%$ ) no modificó el porcentaje de agregación respecto del control (*Fig. 6*).

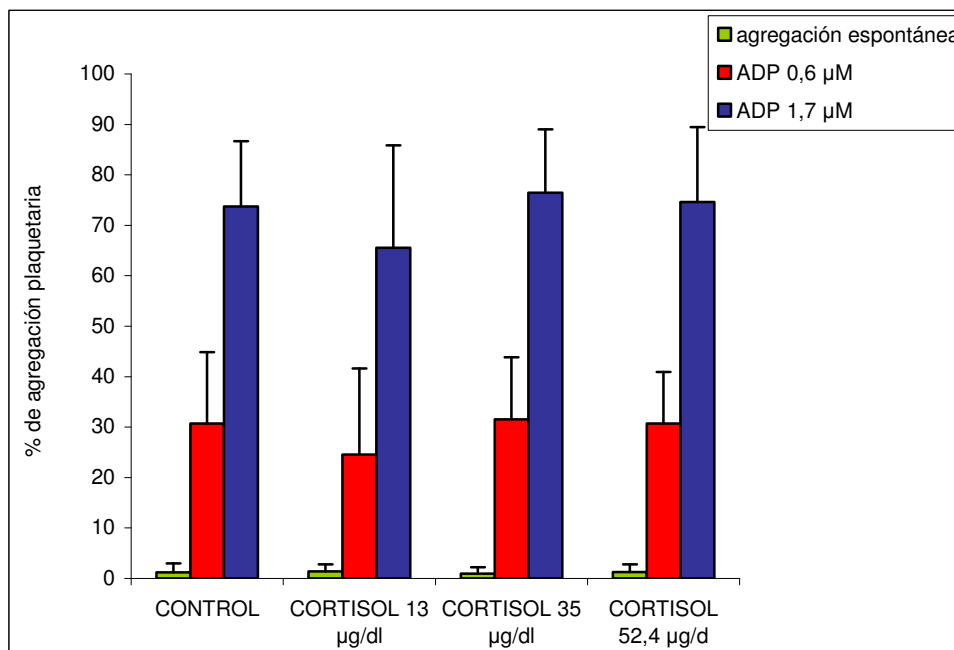


*Figura 6.* Efecto del bloqueo de los receptores de ADP sobre el incremento de agregación plaquetaria inducido por ACTH. A3P5PS (100 ó 10  $\mu\text{M}$ ) bloquea el receptor  $\text{P2Y}_1$ . Mientras que, 2MeSAMP (100 ó 10  $\mu\text{M}$ ) bloquea el receptor  $\text{P2Y}_{12}$ . El control (cont) es el porcentaje de agregación plaquetaria inducido por ADP en ausencia o presencia de ACTH, pero sin ninguno de estos inhibidores. ♦ = significación estadística respecto al control con ADP sin ACTH; \* = significación estadística frente al control con ACTH. Se exige un valor de  $p < 0,05$  para considerar las diferencias estadísticamente significativas.

#### Análisis del efecto del cortisol sobre la agregación espontánea y la inducida por ADP

El análisis de la agregación plaquetaria de voluntarios sanos, mostró que la incubación de las muestras de Prp con cualquiera de las concentraciones de cortisol empleadas en ausencia de un agonista (agregación espontánea), no tiene efectos estadísticamente significativos sobre el porcentaje de agregación.

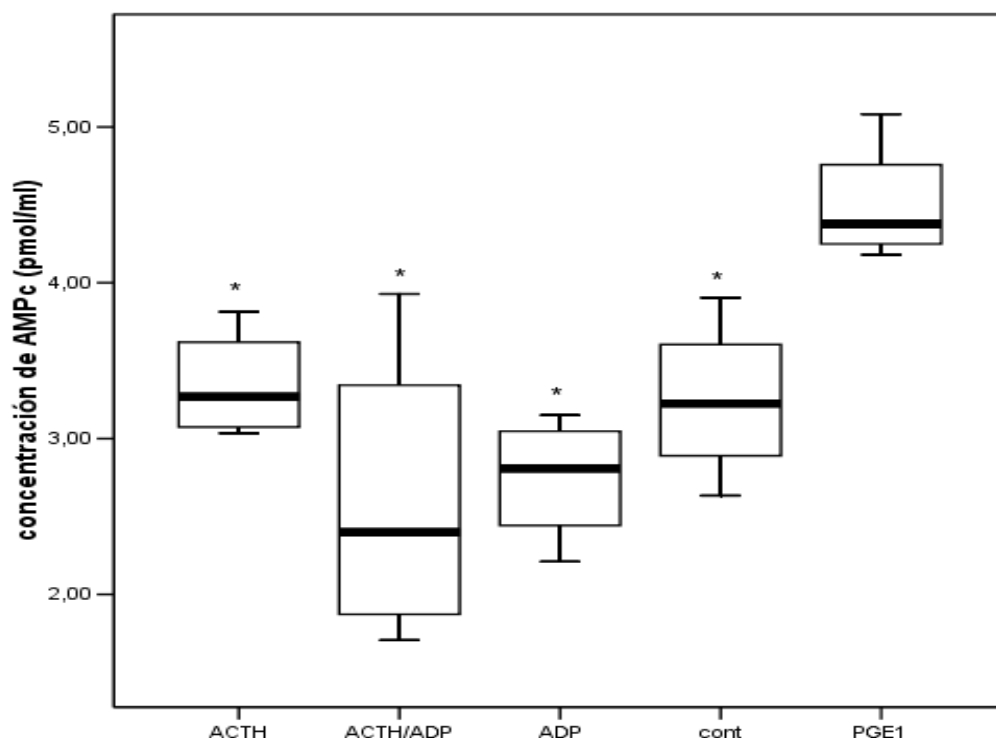
Al evaluar el efecto del cortisol en la agregación plaquetaria inducida por ADP, tampoco se observaron diferencias significativas en la agregación con ninguna de las concentraciones empleadas de esta hormona (*Fig. 7*).



*Figura 7.* Efecto de concentraciones fisiológicas (13 y 35 μg/dl) y suprafisiológicas (52,4 μg/dl) de cortisol sobre la agregación plaquetaria. El control es la agregación plaquetaria sin cortisol.

#### Determinación de los niveles de AMPc en plaquetas incubadas con ACTH

La incubación de las muestras con PGE1 dio lugar a un aumento significativo ( $p = 0,019$ ) de la producción de AMPc por las plaquetas. Sin embargo, la incubación del Prp con ADP, ACTH o ambos, no produjo diferencias significativas respecto al control, tampoco se observaron diferencias significativas entre estos tratamientos (*Fig. 8*).



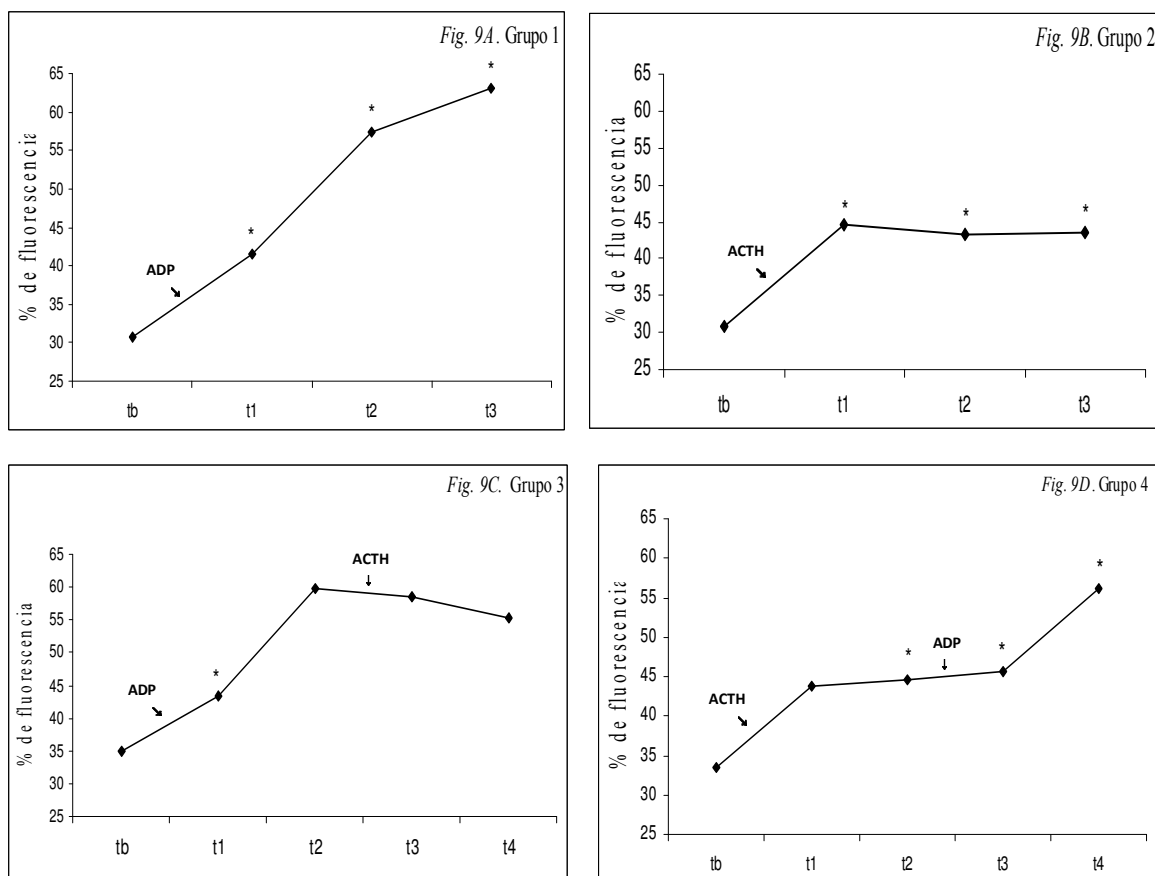
*Figura 8.* Producción de AMPc por plaquetas tratadas con PGE1 (1  $\mu$ M) como control positivo, ADP (1,7  $\mu$ M), ACTH (100 pg/ml), ACTH y ADP, o suero fisiológico (cont). \* = significación estadística respecto a las muestras incubadas con PGE1, se exige un valor de  $p < 0,05$  para considerar las diferencias estadísticamente significativas.

#### Determinación de la movilización de calcio intraplaquetario en respuesta a la incubación con ACTH

Mediante el análisis de la movilización de calcio por citometría se observó que, tras la adición de ADP a las muestras, se produjo un aumento significativo ( $p = 0,006$ ) de los niveles de calcio intraplaquetarios.

La concentración de 100 pg/ml de ACTH empleada en estos experimentos no modificó significativamente la movilización de calcio en plaquetas estimuladas únicamente con esta hormona, ni tampoco en aquellas en las que se indujo la movilización de calcio con ADP, tanto si la ACTH fue añadida antes o después del agonista.

Cuando empleamos 200 pg/ml de ACTH para inducir la movilización de calcio, se encontró un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) de los niveles intraplaquetarios de calcio poco después de añadir la hormona. Sin embargo, el incremento producido por la ACTH es menor que el que produce el ADP. La activación conjunta, con la hormona y el agonista, no supone un aumento mayor que el que produciría cualquiera de estas moléculas por separado (*Fig. 9*).



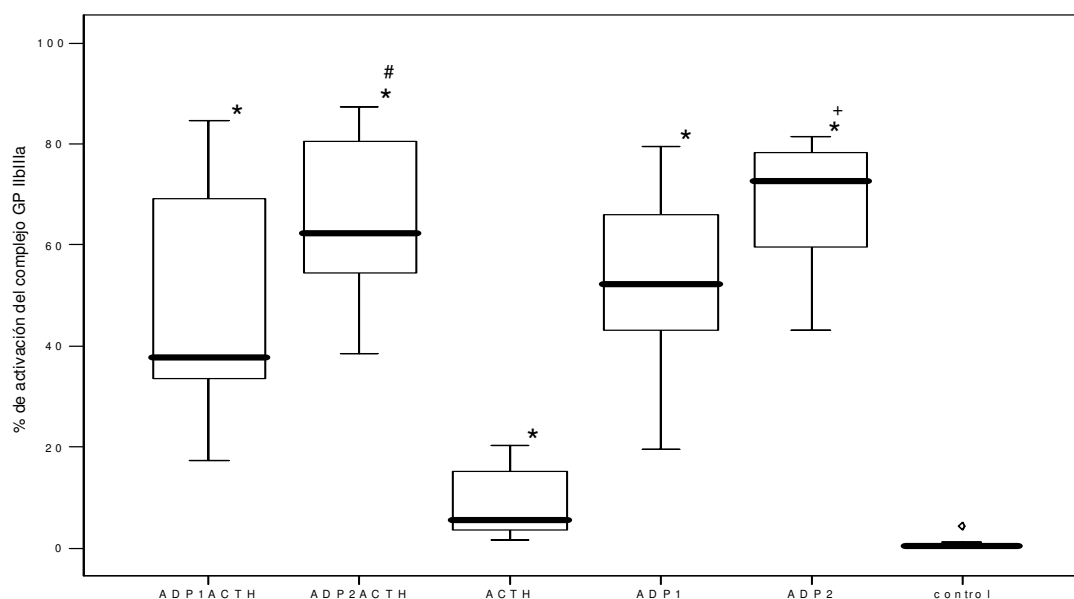
*Figura 9.* Determinación de la movilización de calcio por citometría de flujo. Se determinaron los niveles de calcio basales (tb) en cada muestra. A continuación, se añadió ADP en el grupo 1 (9A) y en el grupo 3 (9C), y 200 pg/ml de ACTH en el grupo 2 (9B) y en el grupo 4 (9D). Se registraron los niveles de calcio en t1, t2 y t3 (30, 90 y 150 segundos) en los grupos 1 y 2. A los 90 segundos de añadir ADP o ACTH, añadimos 200 pg/ml de ACTH en el grupo 3 y ADP en el grupo 4, y se analizaron los niveles de calcio en t3 y t4 (150 y 210 segundos). \* = significación estadística frente a los niveles basales, se exige un valor de  $p < 0,05$  para considerar las diferencias estadísticamente significativas.



### Evaluación de la activación plaquetaria

La inducción de las muestras con un agonista fisiológico (ADP) produjo un incremento significativo en la activación de GP IIbIIIa ( $p < 0,001$ ) respecto del control (muestras sin tratar). Además, se encontraron diferencias significativas ( $p = 0,004$ ) entre las dos concentraciones de ADP utilizadas en el experimento, siendo mayor la activación provocada por la concentración de ADP 2  $\mu\text{M}$  que por la concentración menor (0,5  $\mu\text{M}$ ).

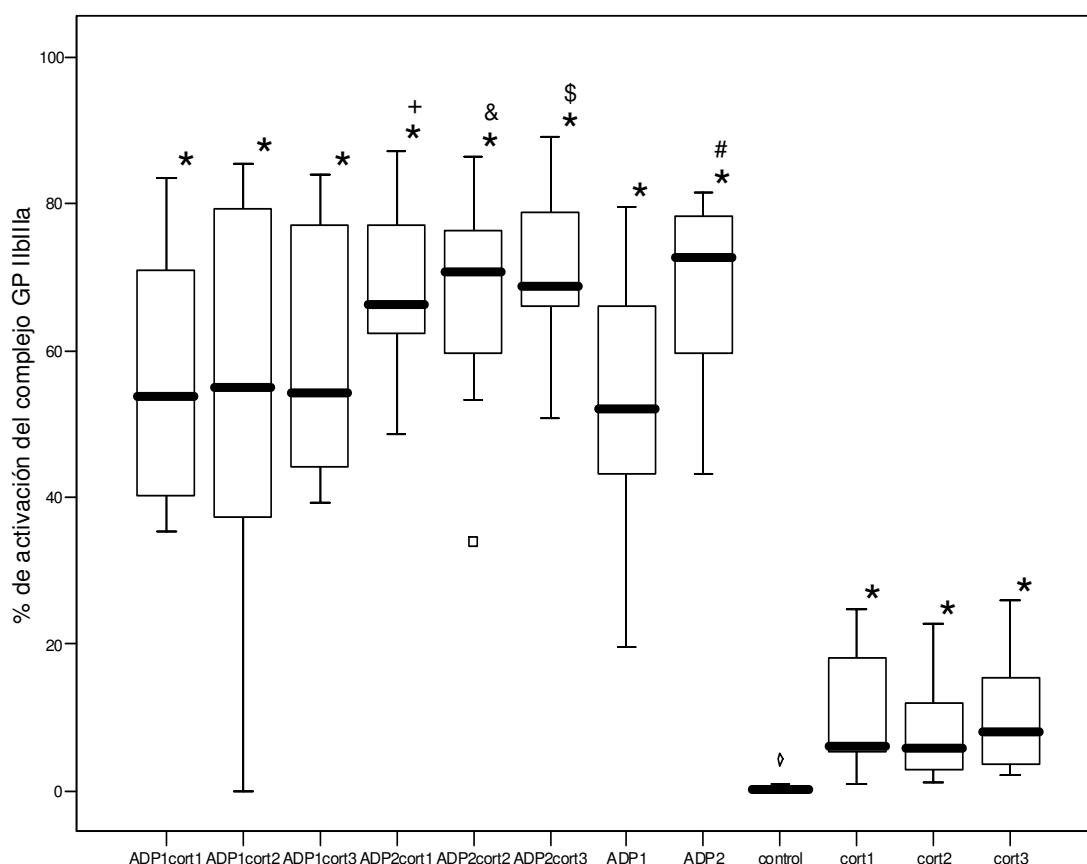
Al evaluar el efecto de la ACTH, se encontró que la hormona por si misma, activa el receptor de fibrinógeno, produciendo un incremento de la activación estadísticamente significativo ( $p = 0,004$ ) con respecto al control. El aumento que produce la ACTH junto con el agonista sobre el receptor, no presenta diferencias significativas respecto de las muestras inducidas únicamente con cualquiera de las dos concentraciones de ADP probadas. La activación del receptor producida por la incubación con la hormona y la concentración de 2  $\mu\text{M}$  de ADP, fue significativamente superior ( $p = 0,001$ ) a la activación producida por la ACTH y la concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  del agonista (*Fig. 10*).



*Figura 10.* Efecto de la ACTH en la activación del complejo GP IIb/IIIa. Control: muestras incubadas en ausencia de ADP y ACTH. ACTH: muestras incubadas con 100 pg/ml de ACTH. ADP1: muestras incubadas con 0,5  $\mu$ M de ADP. ADP2: muestras incubadas con 2  $\mu$ M de ADP. ADP1ACTH: muestras incubadas con ADP 0,5  $\mu$ M de ADP y ACTH. ADP2ACTH: muestras incubadas con 2  $\mu$ M de ADP y ACTH.  $\diamond$  = representa los valores extremos; \* = significación estadística frente al control; # = significación estadística respecto a ADP1ACTH; + = significación estadística frente a ADP1. Se exige un valor de  $p < 0,05$  para considerar las diferencias estadísticamente significativas.

Al analizar el efecto del cortisol, se encontró que la hormona por si misma, es capaz de activar el complejo GP IIb/IIIa, produciendo un incremento del porcentaje de activación estadísticamente significativo ( $p = 0,008$ ,  $p = 0,006$  y  $p = 0,004$  para 13, 35 y 52,4  $\mu$ g/dl de cortisol respectivamente) respecto del control. No se observaron diferencias significativas entre las tres concentraciones de cortisol usadas. El aumento que produce cualquiera de las concentraciones de cortisol junto con el ADP sobre el receptor, no presenta diferencias significativas respecto de las muestras inducidas únicamente con cualquiera de las dos concentraciones de ADP probadas. Sin embargo, sí se observó un incremento significativo ( $p = 0,001$ ,  $p = 0,04$  y  $p < 0,001$  para las concentraciones de 13, 35 y 52,4  $\mu$ g/dl de cortisol respectivamente) de la activación del receptor de fibrinógeno inducida por la incubación de las muestras con la hormona y la

concentración de 2  $\mu\text{M}$  de ADP, respecto de la activación producida por el cortisol y la concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  del agonista (*Fig. 11*).



*Figura 11.* Efecto del cortisol en la activación del complejo GP IIb/IIIa en sangre total. *Control:* muestras incubadas sin cortisol ni ADP. *Cort1:* muestras incubadas con 13  $\mu\text{g/dl}$  de cortisol. *Cort2:* muestras incubadas con 35  $\mu\text{g/dl}$  de cortisol. *Cort3:* muestras incubadas con 52,4  $\mu\text{g/dl}$  de cortisol. *ADP1:* muestras incubadas con 0,5  $\mu\text{M}$  de ADP. *ADP2:* muestras incubadas con 2  $\mu\text{M}$  de ADP. *ADP1cort1:* muestras incubadas con 0,5  $\mu\text{M}$  de ADP y 13  $\mu\text{g/dl}$  de cortisol. *ADP1cort2:* muestras incubadas con 0,5  $\mu\text{M}$  de ADP y 35  $\mu\text{g/dl}$  de cortisol. *ADP1cort3:* muestras incubadas con 0,5  $\mu\text{M}$  de ADP y 52,4  $\mu\text{g/dl}$  de cortisol. *ADP2cort1:* muestras incubadas con 2  $\mu\text{M}$  de ADP y 13  $\mu\text{g/dl}$  de cortisol. *ADP2cort2:* muestras incubadas con 2  $\mu\text{M}$  de ADP y 35  $\mu\text{g/dl}$  de cortisol. *ADP2cort3:* muestras incubadas con 2  $\mu\text{M}$  de ADP y 52,4  $\mu\text{g/dl}$  de cortisol.  $\square$  = valores atípicos;  $\diamond$  = valores extremos; \* = significación estadística respecto del control; # = significación estadística respecto ADP1; + = significación estadística respecto a ADP1cort1; & = significación estadística respecto a ADP1cort2; \$ = significación estadística respecto ADP1cort3. Se exige un valor de  $p < 0,05$  para considerar las diferencias estadísticamente significativas.

Al comparar el efecto producido por cada una de estas hormonas en muestras inducidas con ADP, se puso de manifiesto que concentraciones suprafisiológicas de cortisol (52,4 µg/dl) inducen un incremento estadísticamente mayor ( $p = 0,024$ ) en la expresión del complejo GP IIbIIIa, que el causado por la ACTH y cualquiera de las concentraciones de ADP empleadas en el presente estudio.

## VI. DISCUSIÓN

La aterosclerosis se ha descrito como un desorden inflamatorio, y la relación entre la inflamación y la trombosis ha sido ampliamente estudiada y está bien establecida; la inflamación causa trombosis y la trombosis estimula la inflamación [42,70]. Además, se ha descrito que episodios agudos o crónicos de estrés están relacionados con la trombosis arterial y consecuentemente con los SCA y el infarto cerebral [105,123], y que la activación del eje HPA en respuesta al estrés da lugar a la liberación de hormonas, como la ACTH y el cortisol, las cuales están implicadas en la supresión de la inflamación. Por otro lado, las plaquetas representan un importante nexo de unión entre la inflamación, la trombosis y la aterogénesis. Además de su papel en la hemostasis y la trombosis, las plaquetas regulan diversas respuestas inflamatorias y juegan un importante papel en la aterotrombosis [42].

En nuestro grupo control de cerdos se observó un aumento significativo de los niveles circulantes de cortisol e IL-6, así como del porcentaje de agregación plaquetaria, inmediatamente después de realizar la lesión del vaso, habiéndose puesto de manifiesto la formación de trombo oclusivo en todos los animales a los treinta y cinco minutos de producir el daño vascular. Estos resultados, por tanto, están en concordancia con aquellos estudios previos en los que se demuestra la relación recíproca entre la inflamación y la trombosis [42,70].

Así mismo, tras producir el daño vascular en el subgrupo de estudio G2a, se observó un incremento significativo del porcentaje de agregación plaquetaria y de los niveles circulantes de cortisol, acompañados por la reducción de los niveles circulantes de IL-6 y formación de trombo oclusivo en todos los animales. Estos resultados indican, por primera vez, que la supresión de la inflamación debida al aumento de los niveles circulantes de ACTH exógena y el consecuente aumento de los niveles de cortisol endógeno, está acompañada por trombosis en zonas con daño vascular y que esta trombosis tiene lugar de forma extraordinariamente rápida. De hecho, en estos animales la formación de trombos se produjo en menos de dos minutos, mientras que, en el grupo control este proceso se desarrollaba en un período significativamente superior.

En el subgrupo de estudio G2b se produjo un aumento del porcentaje de agregación plaquetaria poco después de administrar la ACTH. Este incremento de la agregación se acompaña de un aumento de los niveles circulantes de cortisol, pero, al igual que en el subgrupo G2a (ACTH con lesión), los niveles circulantes de IL-6 permanecieron indetectables. Estos resultados indican, por primera vez, que en ausencia de inflamación y de daño vascular, el incremento de los niveles de ACTH y/o cortisol puede, por si mismo, inducir un aumento significativo del porcentaje de agregación plaquetaria y que este incremento en la agregación plaquetaria es similar al ocasionado por la lesión del vaso.

Por otra parte, los resultados obtenidos en los animales de los dos subgrupos de estudio (trombosis sin inflamación, G2a y G2b), dan soporte experimental a estudios clínicos previos en los cuales se encontró en un considerable porcentaje de pacientes con angina inestable, formación de trombos en la luz del vaso en presencia de niveles elevados de cortisol circulante y niveles de IL-6 reducidos [21,28,91].

La diferenciación, *in vivo*, del efecto de la ACTH o el cortisol en la producción de trombos es compleja debido a la estrecha relación existente entre estas dos hormonas. En consecuencia, para diferenciar el papel que juegan la ACTH y el cortisol en la rápida formación de trombos en la zona de lesión, se realizó el estudio *ex vivo*, en el que podemos controlar los niveles de estas hormonas por separado y observar su efecto en la agregación.

En el estudio *ex vivo* se demostró que la ACTH, pero no el cortisol, puede modificar la agregación plaquetaria, y que la ACTH no tiene efecto sobre la agregación espontánea pero actúa sinérgicamente con agonistas fisiológicos incrementando el porcentaje de agregación inducido por ellos.

Mediante el análisis por regresión múltiple se demostró que el porcentaje final de la agregación plaquetaria depende del porcentaje de agregación inicial inducido únicamente por cada uno de los agonistas, del tipo de agonista empleado (ADP, epinefrina o colágeno), y de la concentración de ACTH utilizada. La mediana del IRAP inducido por cualquiera de las concentraciones de ACTH empleadas junto con un agonista fue 31,25%.

El estudio estadístico evidencia que cuanto menor es el porcentaje de agregación plaquetaria inducido por el agonista, mayor es el IRAP producido por la ACTH. De hecho, la disminución de un 1% en el porcentaje de agregación basal aumenta significativamente la probabilidad de que el IRAP sea mayor que la mediana. La acción sinérgica de la ACTH sólo es estadísticamente significativa cuando la agregación inducida por un agonista cualquiera es inferior al 60%. Con respecto al agonista, el ADP incrementa significativamente el riesgo de que el IRAP sea superior a la mediana, frente a la epinefrina o al colágeno. El uso de concentraciones suprafisiológicas de ACTH (200 pg/ml), también aumenta la probabilidad de que el IRAP sea mayor que la mediana, frente a otras concentraciones de la hormona. Por el contrario, el cortisol no ejerce ningún efecto estadísticamente significativo sobre la agregación espontánea o la inducida por agonistas fisiológicos.

El importante papel que tiene el ADP como mediador de la activación plaquetaria en el proceso fisiológico de la hemostasis y en el desarrollo y evolución de la trombosis arterial está bien establecido. La estimulación directa de las plaquetas con ADP, que se origina en los gránulos densos plaquetarios y en células dañadas, da lugar a un cambio de forma, una agregación plaquetaria reversible a concentraciones fisiológicas de calcio y, finalmente, la desensibilización de las mismas [37]. Aunque por sí mismo es considerado un agente agregante débil, el ADP es necesario como cofactor para la activación normal de las plaquetas por otros agonistas como la trombina o el colágeno, los cuales inducen su secreción a partir de los gránulos densos. Además, el ADP a bajas concentraciones potencia y amplifica la acción del resto de agonistas plaquetarios, incluso aquellos con un efecto débil sobre la agregación [35]. El ADP ejerce su acción a través de los receptores plaquetarios P2Y (P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub>), ambos receptores de membrana acoplados a proteína G.

Para definir mejor el mecanismo de acción de la ACTH en la agregación plaquetaria inducida por ADP, evaluamos por separado el papel de esta hormona sobre los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub>, mediante la utilización de antagonistas específicos para cada uno de ellos. Estos experimentos, aportan evidencias de que el bloqueo de estos receptores de ADP anula el efecto sinérgico de la ACTH sobre la agregación.

El receptor  $P2Y_1$ , acoplado a  $G\alpha_q$ , induce movilización de calcio a partir de los reservorios intracelulares, lo que da lugar a un cambio de forma y a una agregación plaquetaria débil y transitoria. Además, este receptor participa en la agregación inducida por el colágeno, está involucrado en la centralización de los gránulos plaquetarios producida por el ADP y en la formación de filopodios (delgadas extensiones plaquetarias que contienen largos haces de filamentos de actina y se unen a fibrina, o a otras plaquetas, para formar el coágulo tridimensional) en las plaquetas activadas [37]. Cuando bloqueamos el receptor  $P2Y_1$  con su antagonista específico (A3P5PS), se produjo una disminución significativa del porcentaje de agregación plaquetaria inducida por el ADP. La adición de ACTH a estas muestras no afectó a la agregación plaquetaria de forma significativa. En consonancia con la literatura previa [35,37,62], al evaluar el papel de la ACTH a través de este receptor, analizando la movilización de calcio intracelular en respuesta al ADP y/o a la ACTH, encontramos, que el ADP, en presencia o ausencia de esta hormona, ocasionó un aumento significativo de la movilización de calcio intracelular. Por el contrario, la ACTH únicamente produjo diferencias significativas en la movilización de calcio cuando se emplearon concentraciones suprafisiológicas (200 pg/ml).

El receptor  $P2Y_{12}$ , acoplado a  $G\alpha_{i2}$ , completa la agregación plaquetaria en respuesta a ADP; en la mayoría de los casos, es responsable del papel de este agonista como cofactor en la amplificación de la activación plaquetaria inducida por bajas concentraciones de otros agonistas y está involucrado en la estabilización de los macroagregados plaquetarios a través de su participación en la activación completa del complejo GP IIb/IIIa [35]. Además, es responsable de la inhibición de la adenilato-ciclase y subsecuentemente de la reducción de la producción de AMPc intracelular [37]. Al bloquear el receptor  $P2Y_{12}$  con su antagonista específico (2MeSAMP), se produjo una disminución significativa del efecto de la ACTH sobre la agregación plaquetaria. También se estudió el papel que ejerce esta hormona, a través del receptor  $P2Y_{12}$ , evaluando la concentración intracelular de AMPc en plaquetas. Nuestros resultados indican que la ACTH no modifica significativamente los niveles intraplaquetarios de AMPc; por tanto, parece poco probable que la ACTH ejerza su efecto sobre la trombosis a través del receptor  $P2Y_{12}$ .



La coactivación de ambos receptores, P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub>, es necesaria para la inducción normal de la agregación plaquetaria por el ADP, ya que la inhibición de cualquiera de ellos por un antagonista produce una inhibición drástica de la agregación [37]. En el presente estudio encontramos que la ACTH estimula el receptor P2Y<sub>1</sub>, pero no el P2Y<sub>12</sub>, lo que puede explicar la ausencia de efectos significativos de esta hormona sobre la agregación espontánea (en ausencia de agonistas).

Una vez que las plaquetas son activadas con una aplicación inicial de ADP pierden su capacidad de respuesta a este agonista. Este estado refractario de las plaquetas al ADP se debe a la desensibilización de los receptores P2Y<sub>1</sub>, mientras que los receptores P2Y<sub>12</sub> permanecen funcionales y pueden responder a estímulos sucesivos de ADP [74]. La inhibición de la respuesta del receptor P2Y<sub>1</sub>, que reduce significativamente la movilización de calcio intracelular, puede evitarse estimulando la vía activada por Gα<sub>q</sub>, al igual que la inhibición de la respuesta del receptor P2Y<sub>12</sub> puede evitarse estimulando la vía activada por Gα<sub>i2</sub> [35]. A la luz de los estudios previos [74], nuestros resultados sugieren un posible mecanismo que puede explicar el efecto sinérgico de la ACTH en la agregación plaquetaria: cuando el receptor P2Y<sub>1</sub> se ha desensibilizado al ADP, la presencia de concentraciones suprafisiológicas de ACTH estimula la movilización de calcio intracelular a través del receptor P2Y<sub>1</sub>, mientras que el receptor P2Y<sub>12</sub>, que permanece funcional, puede continuar siendo estimulado por el ADP, completando así el proceso que conlleva a la agregación plaquetaria.

El complejo GP IIb/IIIa es un miembro de la familia de las integrinas plaquetarias, las cuales están compuestas por heterodímeros, y parece ser que juega un importante papel en el estadio final de la agregación [14] y en la formación de macroagregados plaquetarios, permitiendo la unión entre plaquetas. La interacción del complejo GP IIb/IIIa con los distintos tipos de colágeno, el fibrinógeno y el vWF, en la región subendotelial de la pared del vaso expuesta por el daño microvascular, da lugar a la activación y agregación plaquetaria con la consecuente liberación de mediadores plaquetarios. Se ha sugerido que el bloqueo de este receptor puede evitar la agregación plaquetaria independientemente de la sustancia o sustancias responsables de la activación plaquetaria [133]. Los antagonistas intravenosos de este receptor constituyen potentes drogas antiplaquetarias, que reducen significativamente las complicaciones trombóticas en pacientes a los se han realizado intervenciones coronarias por vía

percutánea y/o han sufrido SCA [12]. Nuestros resultados, por primera vez, muestran que tanto la ACTH como el cortisol inducen un incremento significativo en la expresión del complejo GP IIbIIIa en plaquetas, lo que podría significar un rápido mecanismo de acción de trombosis en la región con daño vascular. Sin embargo, cuando evaluamos el efecto del cortisol en la agregación plaquetaria, observamos que el cortisol no regula significativamente la agregación, lo cual, dada la importancia de los receptores GP IIaIIIb en la agregación plaquetaria, es contradictorio con el efecto del cortisol en la expresión de estos receptores encontrado en el presente estudio. No obstante, es necesario tener presente que nuestros resultados indican que el cortisol incrementa de forma estadísticamente significativa la expresión de los receptores GP IIbIIIa, pero que este incremento es significativamente inferior al inducido por el ADP, que de forma manifiesta ejerce un efecto biológico importante en la regulación de la agregación plaquetaria. Por tanto, nuestros resultados sugieren, que el cortisol si bien incrementa de forma estadísticamente significativa la expresión de los receptores GP IIbIIIa, este aumento carece de significación biológica; el incremento en la expresión de los GP IIbIIIa inducido por el cortisol no es suficiente para regular *per se* la agregación plaquetaria, pero podría ser un factor coadyuvante en este proceso.

Por último, en nuestro estudio, para producir el incremento de los niveles de ACTH y cortisol en animales vivos, y para incubar las plaquetas con concentraciones determinadas de ACTH en el estudio *ex vivo*, se empleó un fármaco cuyo principio activo, la tetracosactrina, está compuesto sólo por los primeros 24 aminoácidos de los 39 que forman la molécula humana de ACTH. Esto podría considerarse como una limitación del trabajo, e incluso podría cuestionarse la interpretación de los datos aportados, en el sentido de que la ACTH o el cortisol endógenos tengan un papel regulador en la activación plaquetaria o la trombosis. Sin embargo, esta droga tiene todas las propiedades fisiológicas de la ACTH humana, incluyendo la inducción de la biosíntesis de mineralocorticoides y glucocorticoides. Además, este fármaco actúa a través de los mismos receptores que la ACTH humana. Por tanto, con las precauciones inherentes a todo estudio experimental, consideramos que nuestros resultados sugieren que la ACTH y, en menor medida, el cortisol endógeno pueden tener un importante papel en la agregación plaquetaria y formación de trombo. De modo que, la regulación farmacológica de los niveles circulantes de estas hormonas puede tener importantes implicaciones terapéuticas en la reducción de los SCA y el infarto cerebral.

## VII. CONCLUSIONES

1. Hemos confirmado la existencia de una relación recíproca entre la inflamación y la trombosis en cerdos no tratados tras lesión vascular.
2. La supresión de inflamación debida al aumento de los niveles de ACTH y, consecuentemente, de cortisol, está acompañada por trombosis en la zona de lesión vascular.
3. El incremento de los niveles de ACTH y/o cortisol, en ausencia de inflamación y daño vascular, induce un aumento significativo de la agregación plaquetaria.
4. La ACTH, pero no el cortisol, potencia la agregación plaquetaria inducida por agonistas fisiológicos (ADP, epinefrina y colágeno) *ex vivo*.
5. La ACTH y, en menor medida, el cortisol, posiblemente regula la expresión de los receptores GP IIbIIIa.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la ACTH es un nexo de unión entre los episodios de estrés y la activación plaquetaria, aportando nuevos puntos de vista sobre la trombosis aguda sin inflamación. De acuerdo con ello, la regulación farmacológica de los niveles circulantes de estas hormonas puede tener importantes implicaciones terapéuticas en la reducción de los SCA y el infarto cerebral.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Agid O, Kohn Y, Lerer B. Enviromental stress and psychiatric illness. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2000; 54 (3): 135-141.
2. Andersen GN, Nagaeva O, Mandrika I, Petrovska R, Muceniece R, Mincheva- Nilsson L *et al.* MC<sub>1</sub> receptors are constitutively expressed on leucocyte subpopulations with antigen presenting and cytotoxic functions. *Clinical and Experimental Immunology* 2001; 126 (3): 441-446.
3. André P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO *et al.* CD40L stabilizes arterial thrombi by a  $\beta_3$  integrin-dependent mechanism. *Nature Medicine* 2002; 8 (3): 247-252.
4. Andreotti F, Davies GJ, Hackett DR, Khan MI, De Bart AC, Aber VR *et al.* Major circadian fluctuations in fibrinolytic factors and possible relevance to time of onset of myocardial infarction, sudden cardiac death and stroke. *The American Journal of Cardiology* 1988; 62 (9): 635-637.
5. Balbona K, Tran H, Godyna S, Ingham KC, Strickland DK, Argraves WS. Fibulin binds to itself and to the carboxyl-terminal heparin-binding region of fibronectin. *The Journal of Biological Chemistry* 1992; 267 (28): 20120-20125.
6. Beumer S, Heijnen HF, IJsseldijk MJ, Orlando E, de Groot PG, Sixma JJ. Platelet adhesion to fibronectin in flow: the importance of von Willebrand factor and glycoprotein Ib. *Blood* 1995; 86 (9): 3452-3460.
7. Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 194: 927-929.
8. Bornstein SR, Chrousos GP. ACTH- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1999; 84 (5): 1729-1736.
9. Boyer JL, Romero-Avila T, Schachter JB, Harden TK. Identification of competitive antagonist of the P2Y<sub>1</sub> receptor. *Molecular Pharmacology* 1996; 50 (5):1323-1329.
10. Brydon L, Magid K, Steptoe A. Platelets, coronary heart disease, and stress. *Brain, Behavior, and Immunity* 2006; 20 (2): 113-119.
11. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber DK, Malcom GT, Smialek J *et al.* Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation* 2001; 103 (7): 934-940.

12. Bussel JB, Kunicki TJ, Michelson AD. Platelets: new understanding of platelets glycoproteins and their role in disease. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2000; 1: 222-240.
13. Camacho A, Dimsdale JE. Platelets and psychiatry: lessons learned from old and new studies. *Psychosomatic Medicine* 2000; 62 (3): 326-336.
14. Chiang TM, Zhu J. A defined peptide that inhibits the formation of glycoprotein IIb and IIIa complex. *Thrombosis Research* 2005; 115 (6): 503-508.
15. Chrousos GP. Regulation and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: the corticotropin-releasing hormone perspective. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 1992; 21 (4): 833-858.
16. Chrousos GP. Stress as a medical and scientific idea and its implications. *Advances in Pharmacology* 1998; 42: 552-556.
17. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *The New England Journal of Medicine* 1995; 332 (20): 1351-1362.
18. Chrousos GP, Gold PW. A healthy body in a healthy mind -and vice versa- the damaging power of “uncontrollable” stress: *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83 (6): 1842-1845.
19. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA: the journal of American Medical Association* 1992; 267 (9): 1244-1254.
20. Cohen S, Doyle WJ, Turner RB, Alper CM, Skoner DP. Emotional style and susceptibility to the common cold. *Psychosomatic Medicine* 2003; 65 (4): 652-657.
21. Crea F, Biasucci LM, Buffon A, Liuzzo G, Monaco C, Caligiuri G *et al.* Role of inflammation in the pathogenesis of unstable coronary artery disease. *The American Journal of Cardiology* 1997; 80 ( Suppl 5A): 10E-16E.
22. Dallman MF, Akana SF, Cascio CS, Darlington DN, Jacobson L, Levin N. Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Recent Progress in Hormone Research* 1987; 43: 113-173.
23. Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1996; 94 (8): 2013-2020.
24. Encio IJ, Detera-Wadleigh SD. The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 1991; 266 (11): 7182-7188.
25. Engler D, Pham T, Fullerton MJ, Ooi G, Funder JW, Clarke IJ. Studies of the secretion of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin into the

- hypophysial-portal circulation of the conscious sheep. I. Effect of an audiovisual stimulus and insulin-induced hypoglycemia. *Neuroendocrinology* 1989; 49 (4): 367-381.
26. Eskandari F, Webster JI, Sternberg EM. Neural immune pathways and their connection to inflammatory disease. *Arthritis Research & Therapy* 2003; 5 (6): 251-261.
  27. Fantidis P, Fernández-Ortíz A, Aragoncillo P, Pérez T, Sanmartín M, López J, *et al.* Efecto del AMPc sobre la función de las células endoteliales y la proliferación fibromuscular tras la lesión de las arterias carótida y coronaria en un modelo porcino. *Revista Española de Cardiología* 2001; 54 (8): 981-989.
  28. Fantidis P, Pérez de Prada T, Fernández-Ortíz A, Garcia Touchard A, Alfonso F, Sabaté M *et al.* Morning cortisol production in coronary heart disease patients. *European Journal of Clinical Investigation* 2002; 32 (5): 304-308.
  29. Fauci AS. Mechanisms of the immunosuppressive and antiinflammatory effects of glucocorticosteroids. *Journal of Immunopharmacology* 1978; 1 (1): 1-25.
  30. Fayad ZA, Fuster V. Clinical imaging of the high-risk or vulnerable atherosclerotic plaque. *Circulation Research* 2001; 89 (4): 305-316.
  31. Folts J. An in vivo model of experimental arterial stenosis, intimal damage, and periodic thrombosis. *Circulation* 1991; 83 (6 suppl): IV3-IV14.
  32. Freedman JE, Loscalzo J. Platelet-monocyte aggregates: bridging thrombosis and inflammation. *Circulation* 2002; 105 (18): 2130-2132.
  33. Friedman TC, Mastorakos G, Newman TD, Mullen NM, Horton EG, Costello R *et al.* Carbohydrate and lipid metabolism in endogenous hypercortisolism: shared features with metabolic syndrome X and NIDDM. *Endocrine Journal* 1996; 43 (6): 645-655.
  34. Fuchs LC, Landas SK, Johnson AK. Behavioral stress alters coronary vascular reactivity in borderline hypertensive rats. *Journal of Hypertension* 1997; 15 (3): 301-307.
  35. Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thrombosis and Haemostasis* 2001; 86 (1): 222-232.
  36. Gachet C. Platelet activation by ADP: the role of ADP antagonist. *Annals of Medicine* 2000; 32 (Suppl 1): 15-20.
  37. Gachet C. The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs. *Pharmacology & Therapeutics* 2005; 108 (2): 180-192.

38. Garlichs CD, John S, Schmeisser A, Eskafi S, Stumpf C, Karl M *et al.* Upregulation of CD40 and CD40 ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia. *Circulation* 2001; 104 (20): 2395-2400.
39. Gawaz M. "Physiology of Hemostasis", en Editorial *Thieme: Blood platelets. Physiology, pathophysiology, membrane receptors antiplatelet principles, and therapy for atherothrombotic diseases*, 2001, págs. 1-3.
40. Gawaz M. "Platelets and Primary Hemostasis", en Editorial *Thieme: Blood platelets. Physiology, pathophysiology, membrane receptors antiplatelet principles, and therapy for atherothrombotic diseases*, 2001, págs. 4-24.
41. Gawaz M. "Platelets and the Pathophysiology of Coronary Heart Disease", en Editorial *Thieme: Blood platelets. Physiology, pathophysiology, membrane receptors antiplatelet principles, and therapy for atherothrombotic diseases*, 2001, págs. 97-117.
42. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 2005; 115 (12): 3378-3384.
43. Gerin W, Pieper C, Levy R, Pickering TG. Social support in social interaction: a moderator of cardiovascular reactivity. *Psychosomatic Medicine* 1992; 54 (3): 324-336.
44. Ghiadoni L, Donald AE, Cropley M, Mullen MJ, Oakley G Taylor M *et al.* Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 2000; 102 (20): 2473-2478.
45. Gilbey P, Spyer P. Essential organization of the sympathetic nervous system. *Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism* 1993; 7 (2): 259-278.
46. Godyna S, Diaz-Ricart M, Argraves WS. Fibulin-1 mediates platelet adhesion via a bridge of fibrinogen. *Blood* 1996; 88 (7): 2569-2577.
47. Goldstein JA, Demetriou D, Grines CL, Pica M, Shoukfeh M, O'Neil WW. Multiple complex coronary plaques in patients with acute myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343 (13): 915-922.
48. Gullette EC, Blumenthal JA, Babyak M, Jiang W, Waugh RA, Frid DJ, *et al.* Effects of mental stress on myocardial ischemia during daily life. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 1997; 277 (19): 1521-1526.
49. Halbreich U, Asnis GM, Zumoff B, Nathan RS, Shindlecker R. Effects of age and sex on cortisol secretion in depressives and normals. *Psychiatry Research* 1984; 13 (13): 221-229.

50. Hallopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V *et al.* Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001; 409 (6817): 202-207.
51. Harbuz M. Neuroendocrine function and chronic inflammatory stress. *Experimental Physiology* 2002; 87 (5): 519-525.
52. Hernandez E, Coehlo D, Missel JR, Kumpinski D. Alteraciones circadianas del sistema cardiovascular. *Revista Española de Cardiología* 2000; 53: 117-122.
53. Hoffmeister HM, Heller W, Seipel L. Activation markers of coagulation and fibrinolysis: alterations and predictive value in acute coronary syndromes. *Thrombosis and Haemostasis* 1999; 82 (Suppl 1): 76-79.
54. Hsu S, DeFranco DB. Selectivity of cell cycle regulation of glucocorticoid receptor function. *The Journal of Biological Chemistry* 1995; 270 (7): 3359-3364.
55. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM Jr *et al.* Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation* 1997; 96 (12): 4219-4225.
56. Iversen PO, Nicolaysen A, Kvernebo K, Benestad HB, Nicolaysen G. Human cytokines modulate arterial vascular tone via endothelial receptors. *Pflüger's Archiv: European Journal of Physiology* 1999; 493 (1-2): 93-100.
57. Ixart G, Alonso G, Szafarczyk A, Malaval F, Nouguié-Soule J, Assenmacher I. Adrenocorticotrophic regulations after bilateral lesions of the paraventricular or supraoptic nuclei and in Brattleboro rats. *Neuroendocrinology* 1982; 35 (4): 270-276.
58. Jantzen HM, Gousset L, Bhaskar V, Vincent D, Tai A, Reynolds EE *et al.* Evidence for two distinct G-protein-coupled ADP receptors mediating platelet activation. *Thrombosis and Haemostasis* 1999; 81 (1): 111-117.
59. Jhon CD, Buckingham JC. Cytokines: regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Current Opinion in Pharmacology* 2003; 3 (1): 78-84.
60. Jin J, Kunapuli SP. Coactivation of two different G-protein coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proceedings of National Academy of Sciences USA (PNAS)* 1998; 95 (14): 8070-8074.
61. Jones MT, Gillham B. Factors involved in the regulation of adrenocorticotrophic hormone/  $\beta$ -lipotropic hormone. *Physiological Reviews* 1988; 68 (3): 743-818.



62. Kahner BN, Quinton TM, Langan S, Kunapuli SP. Do heterotrimeric G proteins redistribute upon G protein-coupled receptor stimulation in platelets?. *Platelets* 2006; 17(6): 397-404.
63. Kamath MV, Fallen EL. Diurnal variations of neurocardiac rhythms in acute myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology* 1991; 68 (2): 155-160.
64. Kiechl S, Egger G, Mayr M, Wiedermann CJ, Bonora E, Oberhollenzer F *et al.* Chronic infections and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from a large population study. *Circulation* 2001; 103 (8): 1064-1070.
65. Kling MA, Roy A, Doran AR, Calabrese JR, Rubinow DR, Whitfield HJ Jr *et al.* Cerebrospinal fluid immunoreactive corticotropin releasing hormone and adrenocorticotropin secretion in Cushing's disease and major depression: Potential clinical implications. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1991; 72 (2): 260-271.
66. Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Gold HK, Yuan J, Narula J *et al.* The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes. *Current Opinion in Cardiology* 2001; 16 (5): 285-292.
67. Labiós M, Martínez F, Gabriel F, Guiral V, Ruiz-Aja S, Aznar J. Cytoplasmic free calcium mobilization in platelets, expression of P-selectin, phosphatidylserine, and microparticle formation, measured by whole blood flow cytometry, in hypertensive patients. Effect of doxazosin GITS. *Thrombosis Research* 2006; 117 (4): 403-409.
68. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420 (6917): 868-874.
69. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105 (9): 1135-1143.
70. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005; 111 (25): 3481-3488.
71. Lim-Tio SS, Keightley MC, Fuller PJ. Determinants of specificity of transactivation by the mineralocorticoid or glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 1997; 138 (6): 2537-2543.
72. López Messa JB, Garmendia JR, Aguilar MD, Andrés JM, Alberola C, Ardura J. Cardiovascular risk factors in the circadian rhythm of acute myocardial infarction. *Revista Española de Cardiología* 2004; 57 (9): 850-858.
73. Lundblad JR, Roberts JL. Regulation of proopiomelanocortin gene expression in pituitary. *Endocrine Reviews* 1988; 9 (1): 135-158.

74. Malinin A, Pokov A, Swaim L, Kotob M, Serebruany V. Validation of a VerifyNow-P2Y12 cartridge for monitoring platelet inhibition with clopidogrel. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 2006; 28 (5): 315-322.
75. Mann J, Davies MJ. Mechanisms of progression in native coronary artery disease: role of healed plaque disruption. *Heart (British Cardiac Society)* 1999; 82 (3): 265-268.
76. Maseri A, Fuster V. Is there a vulnerable plaque?. *Circulation* 2003; 107 (16): 2068-2071.
77. Mcfarlane RG, Biggs R. Observation on fibrinolysis: spontaneous activity associated with surgical operations, trauma etc. *Lancet* 1947; 2: 862-864.
78. Millar-Craig MW, Bishop CN, Raftery EB. Circadian variation of blood pressure. *Lancet* 1978; 1 (8068): 795-797.
79. Moulton KS. Plaque angiogenesis and atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports* 2001; 3 (3): 225-233.
80. Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 1992; 257 (5074): 1248-1251.
81. Muglia LJ, Jacobson L, Weninger SC, Luedke CE, Bae DS, Jeong KH *et al.* Impaired diurnal adrenal rhythmicity restored by constant infusion of corticotrophin releasing hormone in corticotrophin releasing hormone-deficient mice. *The Journal of Clinical Investigation* 1997; 99: 2923-2929.
82. Mulcahy D. "Circadian" variation in cardiovascular events and implications for therapy?. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1999; 34 (Suppl 2): S3-S8.
83. Mulcahy D, Keegan J, Cunningham D, Quyyumi A, Crean P, Park A *et al.* Circadian variation of total ischemic burden and its alteration with anti-anginal agents. *Lancet* 1988; 2 (8614): 755-759.
84. Mulcahy D, Purcell H, Fox K. Should we get up in the morning? Observations on circadian variation in cardiac events. *British Heart Journal* 1991; 65 (6): 299-301.
85. Muller JE, Tofler GH, Stone PH. Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation* 1989; 79 (4): 733-743.
86. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J *et al.* From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies. Part I. *Circulation* 2003; 108 (4):1664-1672.

87. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger *et al.* From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies. Part II. *Circulation* 2003; 108 (4): 1772-1778.
88. Nanthakumar K, Newman D, Paquette M, Greene M, Rakovich G, Dorian P. Circadian variation of sustained ventricular tachycardia in patients subject to standard adrenergic blockade. *American Heart Journal* 1997; 134: 752-757.
89. Negrao AB, Deuster PA, Gold PW, Singh A, Chrousos GP. Individual reactivity and physiology of the stress response. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2000; 54 (3): 122-128.
90. Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C *et al.* Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation* 1997; 95 (10): 2387-2394.
91. Niccoli G, Biasucci LM, Biscione C, Buffon A, Siviglia M, Conte M *et al.* Instability mechanisms in unstable angina according to baseline serum levels of C-reactive protein: the role of thrombosis, fibrinolysis and atherosclerotic burden. *International Journal Cardiology.* 2007; 122 (3): 245-247.
92. Ogston D, McDonald GA, Fullerton HW. The influence of anxiety on tests of blood coagulability and fibrinolytic activity. *Lancet* 1962; 2: 521-523.
93. Packhan MA, Mustard JF. The role of platelets in the development and complications of atherosclerosis. *Seminars in Hematology* 1986; 23 (1): 8-26.
94. Panarelli M, Holloway CD, Fraser R, Connell JM, Ingram MC, Anderson NH *et al.* Glucocorticoid receptor polymorphism, skin vasoconstriction, and other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83 (6):1846-1852.
95. Pasceri VWJ, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000; 102 (18): 2165-2168.
96. Passoni F, Morelli B, Seveso G, Lazzati L, Beria G, Del Rosso G *et al.* Comparative short-term prognostic value of hemostatic and inflammatory markers in patients with non-ST elevation acute coronary syndromes. *Italian Heart Journal* 2002; 3 (1): 28-33.
97. Petrides JS, Gold PW, Mueller GP, Singh A, Stratakis C, Chrousos GP *et al.* Marked differences in functioning of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis between groups of men. *Journal of Applied Physiology* 1997; 82 (6): 1979-1988.

98. Petrides JS, Mueller GP, Kalogeras KT, Chrousos GP, Gold PW, Deuster PA. Exercise-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: marked differences in the sensitivity to glucocorticoid suppression. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1994; 79 (2): 377-383.
99. Rosenfeld BA, Faraday N, Campbell D, Sakima N, Bell W. The effects of bedrest on circadian changes in hemostasis. *Thrombosis and Haemostasis* 1994; 72 (2): 281-284.
100. Rosing DR, Brakman P, Redwood DR, Goldstein RE, Beiser D, Astrup T *et al.* Blood fibrinolytic activity in man: diurnal variation and the response to varying intensities of exercise. *Circulation Research* 1970; 27 (2): 171-184.
101. Rosmond R, Dallman MF, Bjorntorp P. Stress-related cortisol secretion in men: relationships with abdominal obesity and endocrine, metabolic and hemodynamic abnormalities. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83 (6): 1853-1859.
102. Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine* 1999; 340 (2):115-125.
103. Rousselle JG, Blascovich J, Kelsey RM. Cardiorespiratory response under combined psychological and exercise stress. *International Journal Psychophysiology* 1995; 20 (1): 49-58.
104. Rozanski A, Blumenthal JA, Davidson KW, Saab PG, Kubzanski L. The epidemiology, pathophysiology, and management of psychosocial risk factors in cardiac practice: the emerging field of behavioral cardiology. *Journal of the American College of Cardiology* 2005; 45 (5): 637-651.
105. Rozanski A, Blumenthal JA, Kaplan J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation* 1999; 99 (16): 2192-2217.
106. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nature Medicine* 2002; 8 (11): 1227-1234.
107. Sambola A, Osende J, Hathcock J, Degen M, Nemerson Y, Fuster V *et al.* Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity. *Circulation* 2003; 107 (7): 973-977.
108. Savage B, Cattaneo M, Ruggeri ZM. Mechanisms of platelet aggregation. *Current Opinion in Hematology* 2001; 8 (5): 270-276.

109. Sawchenko PE, Imaki T, Potter E, Kovács K, Imaki J, Vale W. The functional neuroanatomy of corticotropin-releasing factor. *Ciba Foundation Symposium 172. Chichester, United Kingdom: John Wiley*, 1993: 5-29.
110. Sawchenko PE, Swanson LW, Vale WW. Co-expression of corticotropin releasing factor and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons of the adrenalectomized rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA (PNAS)* 1984; 81 (6): 1883-1887.
111. Scheier MF, Matthews KA, Owens JF, Schulz R, Bridges MW, Magovern GJ *et al.* Optimism and rehospitalization after coronary artery bypass graft surgery *Archives of Internal Medicine* 1999; 159 (8): 829-835
112. Sharpley CF. Psychosocial stress-induced heart rate reactivity and atherogenesis: cause of correlation?. *Journal of Behavioral Medicine* 1998; 21 (5): 411-432.
113. Singh A, Petrides JS, Gold PW, Chrousos GP, Deuster PA. Differential hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity to psychological and physical stress. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1999; 84 (6): 1944-1948.
114. Smits PC, Pasterkamp G, Quarles van Ufford MA, Eefting FD, Stella PR, de Jaegere PP *et al.* Coronary artery disease: arterial remodelling and clinical presentation. *Heart (British Cardiac Society)* 1999; 82 (4): 461-4464.
115. Strike PC, Steptoe A. Behavioral and emotional triggers of acute coronary syndromes: a systematic review and critique. *Psychosomatic Medicine* 2005; 67 (2): 179-186.
116. Tofler GH, Brezinski D, Schafer AI, Czeisler CA, Rutherford JD, Willich SN *et al.* Concurrent morning increased in platelet aggregability and the risk of myocardial infarction and sudden cardiac death. *The New England Journal of Medicine* 1987; 316 (24): 1514-1518.
117. Tran H, Tanaka A, Litvinovich SV, Medved LV, Haudenschild CC, Argraves WS. The interaction of fibulin-1 with fibrinogen: A potential role in hemostasis and trombosis. *The Journal of Biological Chemistry* 1995; 270 (33): 19458-19464.
118. Tsigos C, Chrousos GP. Differential diagnosis and management of Cushing's syndrome. *Annual Review of Medicine* 1996; 47: 443-461.
119. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* 2002; 53 (4): 865-871.

120. Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiological Reviews* 1999; 79 (1): 1-71.
121. Valle GA, Lemberg L. Circadian influence in cardiovascular disease-part two. *Chest* 1990; 98 (1): 218-221.
122. Van Cauter E, Leproult R, Kupfer DJ. Effects of gender and age on the levels of circadian rhythmicity of plasma cortisol. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996; 81 (7): 2468-2473.
123. Vanitallie TB. Stress: a risk factor for serious illness. *Metabolism: Clinical and Experimental* 2002; 51 (6 Suppl 1): 40-45.
124. Varnava AM, Mills PG, Davies MJ. Relationship between coronary artery remodelling and plaque vulnerability. *Circulation* 2002; 105 (8): 939-943.
125. Verma SLS, Badiwala MV, Weisel RD, Fedak PW, Li RK, Dhillon B *et al.* Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation* 2002; 105 (16): 1890-1896.
126. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2000; 20 (5): 1262-1275.
127. Whitnall MH. Regulation of the hypothalamic corticotropin releasing hormone neurosecretory system. *Progress in Neurobiology* 1993; 40 (5): 573-629.
128. Willich SN. Epidemiologic studies demonstrating increased morning incidence of sudden cardiac death. *The American Journal of Cardiology* 1990; 66 (16): 15G-17G.
129. Willich SN, Goldberg RJ, Maclure M, Perriello L, Muller JE. Increased onset of sudden cardiac death in the first three hours after awakening. *The American Journal of Cardiology* 1992; 70 (1): 65-68.
130. Winther K, Hillegass W, Tofler GH, Jiménez A, Brezinski DA, Scahfer AI *et al.* Effects on platelet aggregation and fibrinolytic activity during upright posture and exercise in healthy men. *The American Journal of Cardiology* 1992; 70 (11): 1051-1055.
131. Zornosa J, Smith M, Little W. Effect of activity on circadian variation in time of onset of acute myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology* 1992; 69 (12): 1089-1090.

132. Zucker MB Platelet Aggregation measured by the photometric method. *Methods in enzymology* 1989; 169: 117-133.

#### PUBLICACIONES EN EL PERÍODO DE TESIS

- de Prada TP, **Pozzi AO**, Coronado MT, Pouchard MA, Gonzalez P, Bosca L, Fantidis P. Atherogenesis takes place in cholesterol-fed rabbits when circulating concentrations of endogenous cortisol are increased and inflammation suppressed. *Atherosclerosis*. 2007; 191(2): 333-339.
- Pouchard MA, **Ortega Pozzi A**, Perez de Prada T, Torres Coronado M, Gonzalez P, Fantidis P. Monocyte cAMP content is decreased in patients with stable angina. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2007; 27(2):436-437.
- Guinea GV, Atienza JM, Fantidis P, Rojo FJ, **Ortega A**, Torres M, González P, Elices ML, Hayashi M, Elices M. Increases of corporal temperature as a risk factor of atherosclerotic plaque instability. *Annals of Biomedical Engineering* 2008; 36(1): 66-76.
- Guinea GV, Atienza JM, Fantidis P, Rojo FJ, **Ortega A**, Torres M, González P, Elices ML, Hayashi M, Elices M. Effect of atherosclerosis on thermo-mechanical properties of arterial wall and its repercussion on plaque instability. *Internal Journal of Cardiology* 2007 Dec 26 (Epub ahead of print).